Charakterisierung tierischer Zellkulturen anhand einer Quantifizierung intrazellulärer Metaboliten aus dem Zentralstoffwechsel

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieur
(Dr.-Ing.)

von Diplom-Ingenieur Joachim Bernhard Ritter
geboren am 23.05.1977 in München

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl
Prof. Dr. Thomas Noll

eingereicht am 11.08.2009
Promotionskolloquium am 07.04.2010

Forschungsberichte aus dem Max-Planck-Institut
für Dynamik komplexer technischer Systeme

Band 27

Joachim Ritter

Charakterisierung tierischer Zellkulturen anhand einer Quantifizierung intrazellulärer Metaboliten aus dem Zentralstoffwechsel

Shaker Verlag
Aachen 2010

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar.

Zugl.: Magdeburg, Univ., Diss., 2010

Copyright Shaker Verlag 2010
Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-9197-6
ISSN 1439-4804

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen
Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9
Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen meiner Tätigkeiten in der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme in Magdeburg in der Zeit von Dezember 2003 bis April 2009 angefertigt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl, der mir die Möglichkeit geboten hat, unter außerordentlich guten Bedingungen diese Arbeiten durchzuführen, sowie für die anregenden fachlichen Diskussionen und den thematischen Freiraum.

Herrn Prof. Dr. Thomas Noll danke ich sehr für die Übernahme des Koreferats und sein Interesse an der Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Yvonne Genzel für die Betreuung der Arbeit, die generelle Unterstützung und insbesondere die konzeptionelle und fachliche Hilfestellung.

Dr. Aljoscha Wahl danke ich ganz besonders für die interessanten und aufschlussreichen Diskussionen zum Stoffwechsel, für die große Hilfe im Zusammenhang mit der Korrelationsanalyse wie auch für die sehr gute Zusammenarbeit bei gemeinsamen Experimenten.

Großer Dank geht an Susanne König, Claudia Best, Ilona Behrendt, Felicitas Hasewinkel und Liane Geisler für die stete Unterstützung in allen praktischen Belangen.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Katja Hermann und Frau Christina Krämer bedanken, die durch ihre Experimente wichtige Fragen zu Nebenaspekten dieser Doktorarbeit klären konnten.

Allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik danke ich ganz herzlich für die schöne Zeit und die amüsanten aber auch interessanten Gespräche während gemeinsamer Kaffee- oder Mittagspausen. Allen voran waren für mich die anderen Doktoranden „der ersten Stunde“ unersetzbare Wegbegleiter, ohne die ich diese Arbeit wahrscheinlich nicht zu Ende gebracht hätte.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für die Unterstützung in allen Lebenslagen wie auch für den charakterlichen Grundstein, der mich zu dem Menschen hat werden lassen, der ich bin.

Der größte Dank gilt aber meiner Frau Anett, die mir die Perspektive für ein sinnerfülltes Leben bietet.

Kurzfassung

Tierische Zellkulturen werden zu verschiedensten Zwecken eingesetzt, wie z. B. für Toxizitätsstudien oder auch zur Herstellung von Biopharmazeutika. Seit den Anfängen der Zellkultur wurden Zellen aus unterschiedlichsten Organen und Organismen isoliert. Ein nahezu generell vorgefundenes Phänomen bei tierischen Zellkulturen ist der ineffiziente Abbau der Energiesubstrate verglichen mit Zellen im Gewebe. Trotz jahrzehntelanger Forschung zu diesem Thema ist die Ursache dieses veränderten Stoffwechsels weiterhin unklar und zusätzliche Arbeiten sind erforderlich um diese Fragestellung zu klären.

Anhand einer Charakterisierung tierischer Zellkulturen basierend auf den intrazellulären Konzentrationen von Metaboliten aus dem Zentralstoffwechsel sollte mit der vorliegenden Arbeit ein Beitrag zum besseren Verständnis des Stoffwechsels von kultivierten Zellen geleistet werden.

Hierfür war es allerdings zuerst erforderlich, eine verlässliche analytische Methode zur Quantifizierung von intrazellulären Metaboliten zu entwickeln.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde eine Anionen-Austausch Chromatographiemethode zur Trennung und Detektion von organischen Säuren, Zuckerphosphaten und Nukleotiden etabliert. Das Hauptaugenmerk dieser Methode lag hierbei auf einer hohen chromatographischen Auflösung, einer robusten Quantifizierbarkeit und einer anwenderfreundlichen Bedienbarkeit. Die Nutzung eines elektrolytischen On-Line-Eluentengenerators, zweier serieller analytischer Säulen und zweier Detektoren (Leitfähigkeit und UV) ermöglichte eine hoch reproduzierbare Quantifizierung von über 25 Zwischenprodukten des Zentralstoffwechsels von Säugerzellen in einer Messung. Die komplexe metabolische Zusammensetzung der Proben erforderte jedoch eine bessere Auflösung der Chromatogramme. Diese Anforderung konnte durch die Kopplung eines Massen-Detektors an die bestehende Chromatographieanlage erfüllt werden. Durch die Nutzung dieses Detektors konnten zusätzlich die bereits zugeordneten Chromatographiepeaks in ihrer Identität anhand des jeweiligen charakteristischen Masse/Ladung-Verhältnisses bestätigt werden.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde basierend auf Methoden der statistischen Versuchsplanung eine Probenvorbereitung für die Extraktion von intrazellulären Stoffwechselprodukten ausgewählt und optimiert. Adhärente MDCK-Zellen dienten hierbei als Modellorganismus. Zuerst wurden anhand eines experimentellen Vergleichs von Methoden aus der Literatur zwei grundsätzlich geeignete Methoden identifiziert. Anschließend wurden diese beiden Methoden in zwei aufeinander folgenden Experimenten optimiert. Hierbei dienten vier verschiedene Zielgrößen (*Nukleotidgehalt*, *Fructose-1,6-Bisphosphat-Gehalt*, *Energy Charge*, *Absorptionswert bei 280 nm*) als repräsentative Marker für ein gutes Extraktionsverhalten. Um ein Gesamtoptimum zu finden wurden die vier Zielgrößen durch die Verwendung von *Desirability*-Funktionen kombiniert. Ein weiterer Optimierungsschritt war erforderlich, um schlechte Wiederfindungswerte nach Standardzugabe zu Proben zu vermeiden. Hierfür wurden einzelne, essentielle Schritte der beiden zuvor optimierten

Methoden kombiniert, wodurch eine robuste und verlässliche Methode zur reproduzierbaren Quantifizierung intrazellulärer Metaboliten des Zentralstoffwechsels aus kultivierten tierischen Zellen etabliert werden konnte.

Im dritten Abschnitt der Arbeit wurden unterschiedliche Kultivierungsbedingungen und Zelllinien (MDCK und Vero) anhand der intrazellulären Metabolitkonzentrationen charakterisiert. Erhebliche Konzentrationsänderungen zahlreicher Metaboliten wurden über den Verlauf von *Batch*-Kultivierungen gemessen. Weiterhin konnte eine deutliche Abhängigkeit verschiedener intrazellulärer Konzentrationen vom Zellkulturmedium festgestellt werden. In Pulsexperimenten konnte ein deutlich unterschiedliches Antwortverhalten der intrazellulären Konzentration für verschiedene Metaboliten beobachtet werden. Insbesondere die Zwischenprodukte der Glykolyse wiesen eine sehr schnelle Reaktion auf Änderungen der Glucosekonzentration im Zellkulturüberstand auf.

Anhand einer Korrelationsanalyse wurden Zusammenhänge zwischen den Konzentrationen verschiedener Metaboliten ermittelt. Hierbei zeigte sich ganz deutlich, dass für jeden experimentellen Zustand ein individuelles Korrelationsmuster existierte. Dennoch waren einige Metaboliten auch unter unterschiedlichen Bedingungen stets stark korreliert, wie z. B. Zuckerphosphate oder einige organische Säuren. Bei diesen Metabolitgruppen schien somit eine gemeinsame Regulation vorzuliegen.

Somit konnte mit dieser Arbeit durch die Entwicklung einer robusten und einfach anwendbaren Methode zur Quantifizierung von intrazellulären Metabolitkonzentrationen ein wichtiger Beitrag zur Analyse des Stoffwechsels von adhärenten tierischen Zellen geleistet werden. Darüber hinaus konnte mit dieser Methode eine Charakterisierung von MDCK- und Vero-Zellen anhand von Konzentrationen verschiedener Stoffwechselintermediate des Zentralstoffwechsels erreicht werden.

Abstract

Animal cell cultures are used for various purposes, like the generation of organ transplants, toxicity studies or the production of biopharmaceuticals. Cells from many organs and organisms have been isolated since the early beginnings of cell culture technology. A general property of many cultured animal cells is the fairly inefficient metabolism compared to cells in the tissue. Despite the long history of research on this topic, further investigations are needed to elucidate the biological reasons for the metabolic alteration of cellular metabolism after isolation from organs.

The aim of this work was to characterize animal cell cultures according to intracellular concentrations of metabolites from central metabolism. In such a metabolic profiling approach, external factors and global cellular regulatory mechanisms are reflected. Thus, a unique pattern of every distinct physiological status is obtained.

Therefore, it was necessary to establish an analytical assay for the detection of intracellular metabolites.

In the first stage of this work, an anion-exchange chromatography method for the separation and detection of organic acids, sugar-phosphates and nucleotides was established. Main focus was on a high chromatographic resolution of analytes, robust quantification and convenient applicability. Using an on-line electrolytic eluent generation, two serial analytical columns and two detectors (conductivity and UV) allowed a highly reproducible quantification of more than 25 intermediates from energy metabolism. Metabolic complexity of samples from cells, however, required further resolution of chromatograms. This methodological improvement was accomplished by expanding the chromatography system with a mass-spectrometry detector. This detection also allowed a confirmation of identity of metabolites in samples according to their individual mass/charge-ratio.

In the second stage of this work, a suitable sample preparation for the measurement of intracellular metabolites was identified in a four-step optimization process applying statistical methods for the design of experiments. Adherent MDCK cells cultivated in six-well plates served as biological samples. In the first step, a comparison of several methods common in literature was performed. According to these results, two appropriate procedures were selected and, in the second step, these two methods were independently screened for factors influencing extraction quality based on a fractional-factorial experimental design. Four different response variables (*nucleotide content, fructose-1,6-bisphosphate content, energy charge* and *absorption of samples at 280 nm*) were chosen as representative marker variables for the assessment of extraction quality. In the third step of this optimization process, a detailed characterization and optimization of the two methods was realized by a central composite experimental design. An overall optimum with respect to all response variables was found by using desirability functions. The last step of the optimization procedure was required to overcome deficits regarding poor recoveries for nucleotides when adding standards to samples. Therefore, combining crucial steps from both optimized procedures yielded a

robust and reproducible method for sample preparation for the quantification of all selected intracellular metabolites.

The third stage of this work comprised the characterization of various cultivation conditions according to the intracellular metabolite concentrations for MDCK and Vero cells. Significant changes of intracellular metabolite concentrations were observed over the time course of batch cultivations. Many of the metabolites measured showed a clear dependence of the concentration behavior on cell culture media (serum containing: GMEM-Z vs. serum-free: EpiSerf) or availability of energy substrates in the media. Using pulse experiments, differences in the concentration behavior of intracellular metabolites were found. Especially intermediates from glycolysis showed very fast responses to changes in glucose content of the supernatant. Moreover, the regulatory mechanism of activation of pyruvate-kinase by fructose-1,6-bisphosphate could clearly be followed after the media pulses.

The correlation behavior of different metabolite concentrations varied widely depending on experimental conditions resulting in characteristic correlation matrices for every experiment. Despite this experiment dependent individual correlation pattern, concentrations of metabolites within certain metabolic clusters like sugar-phosphates or some organic acids appeared to be generally correlating well within the cluster. This indicates a joint regulation of metabolic blocks.

Taken together, a powerful method for the analysis of intracellular metabolites was established in this work. Applying this procedure for the characterization of cultured cells to various experimental scenarios allowed a clear distinction between different cell lines and cultivation conditions and additionally, metabolic key points in the central metabolism could be identified.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ... 1

2 Motivation ... 6

3 Theoretische Grundlagen ... 8

3.1 Stoffwechsel tierischer Zellen in Kultur ... 8

3.1.1 Glucosestoffwechsel ... 11

3.1.2 Glutaminstoffwechsel ... 14

3.1.3 Pyruvatstoffwechsel ... 16

3.1.4 Weitere Wachstumssubstrate ... 16

3.1.5 Gegenseitiger Einfluss der Glykolyse und der Glutaminolyse ... 17

3.1.6 Nukleotidstoffwechsel ... 17

3.1.7 Experimentelle Strategien zur Verbesserung der Effizienz des Zentralstoffwechsels ... 18

3.2 Möglichkeiten zur experimentellen Untersuchung des Zentralstoffwechsels ... 19

3.3 Chromatographische Analyse von intrazellulären Stoffwechselprodukten ... 20

3.3.1 Ionen-Austausch-Chromatographie ... 21

3.3.2 Flüssigchromatographie im Bereich *Metabolic Profiling* ... 22

3.3.3 Flüssigchromatographie kombiniert mit Massenspektrometrie-Detektion ... 22

3.4 Probenvorbereitung zur Messung intrazellulärer Metaboliten ... 23

3.4.1 Abstoppen des Metabolismus ... 24

3.4.2 Extraktion ... 25

3.5 Grundlagen der statistischen Versuchsplanung ... 26

3.5.1 Faktorielle Versuchspläne ... 27

3.5.2 Fraktionelle faktorielle Versuchspläne ... 30

3.5.3 *Central Composite* Versuchspläne ... 32

3.5.4 Prüfung der Angemessenheit des Modells ... 33

3.5.5 Optimierung anhand von *Desirability*-Funktionen ... 33

3.6 Korrelationsanalyse von Daten intrazellulärer Metaboliten ... 34

4 Material und Methoden ... 38

4.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien ... 38

4.2 Zellkultur ... 38

4.3 Analytik ... 38

4.3.1 Lumineszenzmessung von ATP ... 38

4.3.2 Zellzählung ... 39

4.3.3 Mikroskopie zur Bestimmung des Zellvolumens ... 39

4.3.4 Bestimmung von Glucose, Lactat, Glutamin, Glutamat und Ammonium ... 40

4.3.5 UV-Messung zur Bestimmung von makromolekularen Verunreinigungen ... 40

4.3.6 Anionen-Austausch Chromatographie zur Bestimmung intrazellulärer Metaboliten ... 40

4.4 Probenvorbereitung zur Bestimmung intrazellulärer Metaboliten ... 41
4.4.1 Untersuchung gängiger Extraktionsmethoden ... 42
4.4.2 Optimierung entsprechend eines fraktionellen faktoriellen Versuchsplans ... 44
4.4.3 Optimierung entsprechend eines *Central Composite* Versuchsplans ... 45
4.4.4 Bestimmung der Wiederfindung ... 46
4.5 Korrelationsanalyse ... 46
4.6 Pulsexperimente ... 48
5 Ergebnisse und Diskussion ... 49
5.1 Etablierung einer Chromatographiemethode zur Messung intrazellulärer Metaboliten ... 49
5.1.1 Anionen-Austausch Chromatographie mit der Anlage DX320 ... 49
5.1.1.1 Optimierung des Gradientenprogramms zur Elution der Metaboliten ... 49
5.1.1.2 Validierung der Chromatographiemethode ... 54
5.1.1.3 Effekte des pH-Wertes auf die Quantifizierung der Metaboliten ... 55
5.1.1.4 Messung von Metaboliten mittels Massenspektrometrie ... 56
5.1.1.5 Bestimmung der Standardabweichung der Chromatographiemethode unter realen Messbedingungen ... 59
5.1.2 Anionen-Austausch Chromatographie mit der Anlage DX600 ... 61
5.1.3 Diskussion der etablierten Chromatographiemethode ... 63
5.1.3.1 Etablierung der Chromatographiemethode mit der Anlage DX320 und Identifikation der Metaboliten ... 63
5.1.3.2 Validierung der Methode und Bestimmung der Standardabweichung unter realen Messbedingungen ... 64
5.1.3.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Quantifizierung ... 66
5.1.3.4 Anwendbarkeit der Anlage DX600 ... 67
5.1.4 Zusammenfassung der Etablierung einer Chromatographiemethode ... 67
5.2 Optimierung der Probenvorbereitung ... 68
5.2.1 Untersuchung von in der Literatur häufig genutzten Extraktionsmethoden ... 69
5.2.2 Optimierung zwei unabhängiger Extraktionsmethoden ... 70
5.2.2.1 Fraktioneller faktorieller Versuchsplan zur Optimierung ... 70
5.2.2.2 *Central Composite* Versuchsplan zur weiteren Optimierung ... 74
5.2.3 Experimenteller Vergleich der zwei optimierten Methoden ... 77
5.2.3.1 Wiederfindung zugegebener Metaboliten zu Proben ohne Zellen ... 77
5.2.3.2 Extraktion der Metaboliten aus Zellen ... 78
5.2.4 Abschließende Modifikation: Entwicklung der finalen Methode „MeOH/$CHCl_3$/Kochen“ . 81
5.2.5 Bestimmung der Varianz der Methode ... 83
5.2.6 Bestimmung der Metabolitkonzentrationen durch Abschätzung des Zellvolumens ... 85
5.2.7 Diskussion der etablierten Probenvorbereitungsmethode ... 88
5.2.7.1 Vergleich der Methoden aus der Literatur ... 88

5.2.7.2 Fraktioneller faktorieller Versuchsplan 90
5.2.7.3 *Central Composite* Versuchsplan 91
5.2.7.4 Vergleich der optimierten Methoden und abschließende Modifikationen 91
5.2.7.5 Bestimmung der Varianz der vollständigen Methode 95
5.2.7.6 Abschätzung des Zellvolumens 96
5.2.8 Zusammenfassung zur Optimierung einer Probenvorbereitungsmethode 99
5.3 Untersuchung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen tierischer Zellen 100
5.3.1 Generelles Korrelationsverhalten von intrazellulären Metabolitkonzentrationen 101
5.3.2 Kultivierung von MDCK-Zellen 105
5.3.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener Kultivierungen 105
5.3.2.2 Kultivierung in GMEM-Z bzw. EpiSerf Medium 111
5.3.2.3 Kultivierung in DMEM-Medium mit unterschiedlichen Substraten 134
5.3.3 Kultivierung von Vero-Zellen 143
5.3.4 Pulsexperimente mit MDCK-Zellen 147
5.3.4.1 Austausch von Medium durch PBS 147
5.3.4.2 Zugabe von Medium nach Limitation 154
5.3.4.3 Zugabe von verschiedenen Substraten nach Limitation 161
5.3.5 Diskussion der intrazellulären Metabolitkonzentrationen für MDCK- und Vero-Zellen im Kontext der Literatur 166
5.3.6 Zusammenfassung der Untersuchungen intrazellulärer Metabolitkonzentrationen 170
6 Zusammenfassung 173
7 Ausblick 176

Abkürzungen

2PG	2-Phosphoglycerat
3PG	3-Phosphoglycerat
AAC	Anionen-Austausch Chromatographie
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Varianzanalyse
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
cAco	*cis*-Aconitat
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CDP	Cytidindiphosphat
CE	Kapillarelektrophorese
$CHCl_3$	Chloroform
CHO	*Chinese Hamster Ovary*
Citr	Citrat
CMC	*Correlation Metric Construction*
CMP	Cytidinmonophosphat
CoA	Coenzym A
CTP	Cytidintriphosphat
Cys	Cystein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHAP	Dihydroxyaceton-Phosphat
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E4P	Erythrose-4-Phosphat
EC	*Enzyme Commission*
ECACC	European collection of animal cell cultures
ESI	Elektrospray-Ionisierung
EtOH	Ethanol
F16bP	Fructose-1,6-Bisphosphat
F1P	Fructose-1-Phosphat
F6P	Fructose-6-Phosphat
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	Fötales Kälberserum
Fum	Fumarat
G1P	Glucose-1-Phosphat
G6P	Glucose-6-Phosphat
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GDP	Guanosindiphosphat
Glc	Glucose
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
GMEM	*Glasgow Minimum Essential Medium*
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
His	Histidin
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
Ile	Isoleucin
Isoc	Isocitrat
Lac	Lactat
LF	Leitfähigkeit
LSM	*Laser Scanning Microscope*
Mal	Malat
MDCK	*Madin-Darby canine kidney*
MeOH	Methanol
Met	Methionin
MS	Massenspektrometrie
NAD (H)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP (H)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NDP	Nukleosiddiphosphat
NMP	Nukleosidmonophosphat
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NTP	Nukleosidtriphosphat
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCS	Perchlorsäure
PEP	Phosphoenolpyruvat
PP_i	Pyrophosphat
Pro	Prolin
Pyr	Pyruvat
R5P	Ribose-5-Phosphat
rp	*reversed phase*
S17bP	Sedoheptulose-1,7-Bisphosphat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Ser	Serin
Suc	Succinat
TCS	Trichloressigsäure
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
TTP	Thymidintriphosphat
Tyr	Tyrosin
UDP	Uridindiphosphat
UDP-Gal	Uridindiphosphat-Galactose
UDP-GalNAc	Uridindiphosphat-N-Acetyl-Galactosamin
UDP-Glc	Uridindiphosphat-Glucose
UDP-GlcNAc	Uridindiphosphat-N-Acetyl-Glucosamin
UDP-GNAc	Summe von UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
α-KG	α-Ketoglutarat

Symbole

Symbol	Einheit	Beschreibung
A, B, …	-	Effekt (statistische Versuchsplanung)
a, b, …	-	charakteristische Versuchseinstellung (statistische Versuchsplanung)
A_1		Anfangswert (Boltzmann-Funktion)
A_2		Endwert (Boltzmann-Funktion)
D	-	*Overall-Desirability* (Gesamtwünschbarkeit, statistische Versuchsplanung)
d_i	-	*Desirability*-Funktion (Wünschbarkeitsfunktion, statistische Versuchsplanung)
dx		Zeitkonstante (Boltzmann-Funktion)
F_0	-	Prüfgröße für den F-Test
FQS	-	Fehlerquadratsumme (ANOVA)
H	-	Höchster Wert der Zielgröße (statistische Versuchsplanung)
I	-	Identitätselement bzw. Mittelwert der Zielgröße des gesamten Experiments (statistische Versuchsplanung)
k	-	Anzahl der Faktoren bei einem 2k faktoriellen Versuchsplan (statistische Versuchsplanung)
m		Masse
m	-	Anzahl der Gruppen (statistische Versuchsplanung)
MFQ	-	Mittlere Fehlerquadratsumme (ANOVA)
N	-	Niedrigster Wert der Zielgröße (statistische Versuchsplanung)
n	-	Anzahl
p	-	Grad der Fraktionierung bei einem 2k-p fraktionellen faktoriellen Versuchsplan (statistische Versuchsplanung)
r	-	Korrelationskoeffizient (Korrelationsanalyse)
s_y		Reststandardabweichung
S	-	Glättungsfaktor (Spline-Glättung)
t	h, min, s	Zeit
V	m^3	Volumen
x	-	skaliertes Niveau einer Einflussgröße (statistische Versuchsplanung)
x		Zeit (Boltzmann-Funktion)
$\bar{x}$, $\bar{y}$	-	Mittelwert aller Messungen der Variablen (Korrelationsanalyse)
x_0		Zentrumswert (Boltzmann-Funktion)
x_i, y_i	-	Werte der Variablen (Korrelationsanalyse)
y		zu interpolierende Variable (Boltzmann-Funktion)
Y	mol/mol	Ausbeutekoeffizient
y_i	-	Zielgröße (statistische Versuchsplanung)
z		Ladung
Z	-	Zielwert der Zielgröße (statistische Versuchsplanung)
α	-	Abstand des Faktorniveaus für Sternpunkte im *Central Composite* Versuchsplan (statistische Versuchsplanung)
β	-	Schätzwert eines Effektes (statistische Versuchsplanung)
ε	-	Fehler (statistische Versuchsplanung)
κ	-	Exponent zur Gewichtung der *Desirability*-Funktion (statistische Versuchsplanung)
τ	h, min	Zeitverschiebung (Korrelationsanalyse)
μ	-	Mittelwert (statistische Versuchsplanung)
μ_{max}	1/h	maximale spezifische Wachstumsrate

1 Einleitung

Die Kultivierung von tierischen Zellen außerhalb des natürlichen Gewebes hatte ihren Anfang vor über 100 Jahren [1-3]. Eine enorme Vielfalt von Zelltypen, Kulturmedien und Kultursystemen kam bis heute zum Einsatz, wobei verschiedenste Zwecke mit diesen Zellkultivierungen verfolgt wurden. Unter anderem dienten kultivierte Zellen als Versuchsobjekt zur Aufklärung von Stoffwechselwegen und molekularbiologischen Vorgängen, als Ersatzsystem für Tierversuche im Bereich der Wirkstoffsuche, als Grundlage zur Züchtung von künstlichen Organen oder auch als Produzenten von pharmazeutisch aktiven Substanzen wie z. B. Antikörpern, rekombinanten Proteinen oder Impfstoffen [1].

Die Versorgung der Zellen mit essentiellen Nährstoffen erfolgt außerhalb des Gewebes durch Kultivierung in meist flüssigen Nährmedien. Anfangs wurden häufig Medienbestandteile tierischen Ursprungs genutzt, aber mittlerweile werden Zellkulturmedien mit definierter Rezeptur bevorzugt, um das Risiko von Kontaminationen mit z. B. Viren zu senken.

Grundsätzlich wird zwischen primären und kontinuierlichen Zellen unterschieden. Während erstere nach der Entnahme aus dem Gewebe nur mit begrenzter Lebensdauer kultiviert werden können, vermehren sich permanente Zellen prinzipiell endlos in Zellkultur. Ursache für diese Fähigkeit kann z. B. eine spontane oder eine durch Viren induzierte Mutation sein [1].

Des Weiteren wird generell zwischen adhärenten Zellen und Suspensionszellen differenziert. Eine Voraussetzung für das Wachstum adhärenter Zellen ist, dass diese Zellen eine geeignete Oberfläche zur Anheftung finden. Suspensionszellen hingegen brauchen keine Wachstumsoberfläche und werden durch Schütteln oder Rühren in Suspension gehalten. Natürlicherweise kommen Suspensionszellen in Blut vor, allerdings wachsen auch zahlreiche transformierte Zellen und Tumorzellen in Suspension [1].

Die Historie der Produktion von pharmazeutisch genutzten Wirkstoffen mit kultivierten tierischen Zellen begann in den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts. Ein Polio-Impfstoff wurde in embryonalen Humanzellen vermehrt. Nach und nach wurden verschiedene Zelllinien für die Produktion von viralen Impfstoffen eingesetzt und eine ganze Reihe von Human- (z. B. Mumps, Masern, Röteln) und Veterinärimpfstoffen (z. B. Maul-und-Klauenseuche, Rinderpest) wurde in der Folge in Zellkulturen hergestellt [2-4]. In den folgenden Jahren wurden zahlreiche weitere Zelllinien aus verschiedenen Geweben isoliert und kultiviert. Verschiedene permanente Zelllinien wurden etabliert, so z. B. HeLa-Zellen, BHK-Zellen, MDCK-Zellen und Vero-Zellen [1]. Parallel begann die Entwicklung von Zellkulturmedien, wobei Eagle ein chemisch definiertes Medium etablierte [1].

Neben der Impfstoffherstellung kam im Zuge der rekombinanten DNA-Technologie die Möglichkeit einer Herstellung von komplexen Glykoproteinen als wichtiger Produktionszweig mit kultivierten Zellen hinzu [2, 4, 5]. Zusätzlich konnten durch die Fusion von Zellen ab den 70er Jahren Hybridoma-Zellen gewonnen werden, welche zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern genutzt wurden [2, 4, 5]. Gerade in jüngerer Vergangenheit entstand ein enormer Markt für monoklonale Antikörper aufgrund des großen diagnostischen und therapeutischen Wertes dieser

Makromoleküle. Chimäre Antikörper stellen mittlerweile einen großen Anteil der sogenannten Blockbuster-Medikamente [2, 4-6]. Vorwiegend genutzte Zelllinien zur Produktion von Glykoproteinen in den letzten Jahren sind CHO-, HEK-293-, Hybridoma-, PER.C6- und NS0-Zellen [2, 4, 5].

Unabhängig vom Produkt ist für den Hersteller ein kosteneffizienter und robuster Prozess wichtig. Aus diesem Grund wird eine hohe Produktivität für die Upstream-Phase angestrebt [2, 7]. Dies bedeutet für einen Prozess mit kultivierten tierischen Zellen, dass Zellen mit einer hohen zellspezifischen Produktivität bevorzugt werden. Darüber hinaus ist typischerweise die Produktivität des Prozesses direkt mit der Anzahl der Zellen korreliert. Normalerweise wird zusätzlich das Zellkulturmedium an die Bedürfnisse der gewählten Zelle angepasst. Das Screening zur Auswahl von Zellklonen und Medien erfolgt meist in kleinen Maßstäben und im Anschluss wird eine Maßstabsvergrößerung in Bioreaktoren durchgeführt. Anschließend werden verfahrenstechnische Parameter optimiert. Die ursprünglich genutzten *Batch*-Betriebsweisen wurden in den letzten Jahren großteils durch *Fed-Batch*-Verfahren ersetzt. Weiterhin bietet sich bei Perfusionsverfahren die Möglichkeit, die Zellen kontinuierlich mit Nährstoffen zu versorgen und zusätzlich das Produkt und metabolische Abfallprodukte zu entfernen. Einen wichtigen Aspekt für viele Zellkulturprozesse stellt die Apoptose dar, da der programmierte Zelltod häufig das Ende der jeweiligen Prozesse bedeutet [5, 6, 8]. Durch das verbesserte Verständnis des Wachstums, der Molekularbiologie und des Stoffwechsels von tierischen Zellkulturen konnten die Ausbeuten dieser Prozesse erheblich gesteigert werden. Insbesondere für die Produktion von Antikörpern konnte in den letzten 20 Jahren die Produktivität um das 100fache verbessert werden [5, 6].

Neben den quantitativen Aspekten der Produktion von pharmazeutisch genutzten Wirkstoffen spielt die Qualität dieser Moleküle eine entscheidende Rolle. Während die Aminosäuresequenz eines Proteins durch die Expression des entsprechenden Gens determiniert ist, ist die Beeinflussung der gebildeten Glykanstrukturen deutlich schwieriger. Da die Wirksamkeit eines Proteins häufig auf diesen Glykanstrukturen basiert, ist eine essentielle Aufgabe bei der Produktion von Biopharmazeutika, die entsprechend wirksamen Glykosylierungsprofile reproduzierbar herzustellen. Zahlreiche Prozessparameter haben einen Einfluss auf die Bildung der Glykanstrukturen. Unter anderem unterscheiden sich verschiedene Zelllinien in den von ihnen exprimierten Enzymen, die verantwortlich sind für die Glykosylierung der Proteine. Darüber hinaus spielen z. B. der pH-Wert der Kultur, die Nährstoffversorgung, die Konzentration von Abfallprodukten oder auch die Temperatur wichtige Rollen für die Ausbildung der korrekten Zuckerstrukturen [5, 9]. Aber auch andere posttranslationale Modifikationen, wie z. B. die Ausbildung von Disulfidbrücken, Methylierungen, Hydroxylierungen, Phosphorylierung einzelner Aminosäuren oder vermittelte Proteinfaltungsprozesse beeinflussen die Wirksamkeit von Proteinen [10, 11].

Während die oben genannten Impfstoffe schon seit Beginn der 70er Jahre in Zellkultur hergestellt werden, findet die Produktion von Influenza-Impfstoffen auch heute noch großteils in Hühnereiern statt. Aktuelle Entwicklungen allerdings gehen auch für Influenza-Impfstoffe zu

zellkulturbasierenden Impfstoffen, da diese Prozesse insbesondere wegen ihrer höheren Flexibilität und Skalierbarkeit Vorzüge bieten [12, 13]. Für diese Prozesse kommen vor allem MDCK- [12, 14-16], Vero- [17] und PER.C6-Zellen [18] zum Einsatz.

Der Upstream-Prozess eines typischen Herstellungsprozesses von Influenza-Impfstoffen mittels MDCK-Zellkulturen umfasst zwei Phasen. In den ersten 72 – 96 h findet das Zellwachstum statt. Anschließend wird die Kultur mit aktivem Virus infiziert, so dass in den folgenden 48 – 96 h die Replikation des Virus stattfindet [14]. Ebenso findet die Virusproduktion mit anderen Zelllinien meist zweiphasig statt [17, 18].

Unabhängig von der vergleichsweise langen Geschichte der Impfstoffherstellung in tierischen Zellen, sind die Produktivitäten bei diesen Prozessen in der Regel deutlich niedriger als für Herstellungsprozesse von vielen Antikörpern oder rekombinanten Proteinen. Ein Grund hierfür ist, dass deutlich mehr Forschungsarbeit in den Herstellungsprozess von Glykoproteinen investiert wurde, als für die Impfstoffproduktion. Eine weitere Ursache könnte sein, dass der intrazelluläre Replikationsprozess von Viren deutlich komplexer ist, als die Expression von Proteinen.

Aus diesem Grund wird von der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik am Max-Planck-Institut in Magdeburg seit einigen Jahren intensiv an einer genaueren Aufklärung der relevanten biologischen und verfahrenstechnischen Parameter für die auf Zellkultur basierenden Influenza-Impfstoff Produktion geforscht.

Eines der Arbeitsgebiete befasst sich mit dem Stoffwechsel der genutzten MDCK- bzw. Vero-Zellen, wobei intensiv extrazelluläre Stoffwechselprodukte in Konzentrationsverläufen von *Batch*-Prozessen untersucht wurden [14, 15, 19-21]. Des Weiteren wurde mittels Metabolischer Stoffflussanalyse der Metabolismus von MDCK-Zellen genauer charakterisiert [22, 23].

Trotz dieser Arbeiten sind zahlreiche Fragen zum Stoffwechsel von Zellen und mit Virus infizierten Zellkulturen offen. Grundsätzlich ist unklar, wie weit der Stoffwechsel der tierischen Zellen durch die Replikation des Influenza-Virus beeinträchtigt ist, und ob eine Limitation der Virusreplikation auf metabolischer Ebene existiert. Generell besteht der Verdacht für solch eine Beeinträchtigung des Wirtszellstoffwechsels, denn es konnten diverse Arbeiten in der Literatur metabolische Auswirkungen von viralen Infektionen auf den Stoffwechsel tierischer Zellen nachweisen [24-30].

Neben dieser speziellen Problematik beim Upstream der Impfstoffherstellung existieren generell für kultivierte tierische Zellen zahlreiche offene Fragen zum Stoffwechsel, wie z. B. nach der Ursache des stark veränderten Stoffwechsels von kultivierten tierischen Zellen verglichen mit dem Stoffwechsel im Gewebe. Die meisten kultivierten Zellen weisen eine ineffiziente Nutzung der Wachstumssubstrate Glucose und Glutamin auf. Da deswegen Abbauprodukte im Zellkulturüberstand akkumulieren und diese Abfallprodukte Zellwachstum bzw. Produktion einschränken können, stellt der Überflussstoffwechsel von Zellkulturen insbesondere für Produktionszwecke ein Problem dar. Gerade an dieser Stelle sind weitere experimentelle Untersuchungen erforderlich, um die regulatorischen Hintergründe aufzuklären und basierend auf rationalen Ansätzen eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen bzw. Zelllinien zu erreichen.

Auch die Forderung nach einer gleichbleibenden Produktqualität ist entscheidend vom Metabolismus der Zellen abhängig. Deshalb ist neben der genauen Charakterisierung des Produktes auch eine detaillierte Untersuchung der Kultivierungszustände, die zu den entsprechenden Produktformen führen, nötig.

Im Bereich der Bioprozesstechnik mit tierischen Zellen beschränken sich die analytischen Verfahren zur Charakterisierung der Kulturen, neben den Online-Sonden für Sauerstoff und den pH-Wert, häufig auf die Bestimmung ausgewählter Metaboliten im Zellkulturüberstand. Typischerweise werden die wichtigsten Substrate Glucose und Glutamin sowie die Hauptabbauprodukte Lactat und Ammonium bestimmt. Eine Erweiterung dessen stellt die Analyse von Aminosäuren im Zellkulturmedium dar. Basierend auf solchen Messungen können z. B. direkt Limitationszustände der Zellen aufgrund von Substratmangel während der Kultivierung erkannt werden bzw. mögliche Inhibierungseffekte durch Abbauprodukte ermittelt werden. Allerdings geben diese Daten nur bedingt Aufschluss über die tatsächlichen Stoffwechselvorgänge in den Zellen. Ein stark wachsender Bereich der Analytik, auch in der Bioprozesstechnik, ist die Metabolomanalyse. Im Falle von tierischen Zellkulturen wäre hierbei das Ziel, sämtliche intrazelluläre Metaboliten der Zellen zu quantifizieren. Da die unterschiedlichen Stoffwechselintermediate ein konkretes, metabolisches Abbild des Zustandes einer Zelle, inklusive aller externen Einflüsse aber auch der molekularbiologischen und biochemischen Effekte, liefern, stellt die Gruppe dieser Biomoleküle hochsensible Messgrößen zur Beurteilung der Physiologie einer Zellkultur dar. Für die Bestimmung von intrazellulären Metaboliten kommen unterschiedliche analytische Verfahren zum Einsatz, wie z. B. Kernresonanzspektroskopie, enzymatische Verfahren oder chromatographische Methoden, häufig gekoppelt an Massenspektrometrie-Detektoren. Die apparatetechnische Herausforderung liegt hier in einer simultanen Bestimmung von möglichst vielen Metaboliten, welche zum Teil sehr stark unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften besitzen. Während die Einstellungen von Messgeräten anhand von kommerziell beziehbaren Standards der Metaboliten erfolgreich optimiert werden können, stellt die dem analytischen Assay vorangehende Probenvorbereitung eine erheblich höhere experimentelle Hürde dar. Mit Ausnahme von nicht invasiven Methoden greifen alle anderen Verfahren auf einen Probenvorbereitung zurück. Eine Herausforderung stellt hierbei die schnelle Umsetzung der Stoffwechselintermediaten im Organismus dar. Dies bedeutet, dass eine Probennahme ebenfalls sehr schnell stattfinden muss und anschließend sämtliche Stoffwechselaktivitäten schlagartig unterbunden werden müssen. Nur so können artifizielle intrazelluläre Metabolitkonzentrationen vermieden werden. Die nächste erhebliche Schwierigkeit bei der Probenvorbereitung ist die Extraktion der Metaboliten aus dem Organismus. Da kein Standard zum intrazellulären Raum zugegeben werden kann, ist es nicht möglich zu überprüfen, ob das Herauslösen der Metaboliten aus den Zellen durch die Probenvorbereitung vollständig erfolgte. Somit kann nur basierend auf einem Vergleich von verschiedenen Methoden beurteilt werden, welche tatsächliche Konzentration wahrscheinlich vorliegt.

Eine weitere Herausforderung bei der Bestimmung von intrazellulären Metabolitkonzentrationen ist die höchstwahrscheinlich inhomogene Verteilung der Metaboliten im Zellinneren. Zwar kann durch aufwendige Methoden eine Unterscheidung zwischen der Konzentration im Cytosol und dem Mitochondrien unterschieden werden, aber weitere Kompartimente existieren und darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass selbst im Cytosol Konzentrationsgradienten vorliegen.

Unabhängig von den hier beschriebenen Schwierigkeiten existieren in der Literatur unzählige verschiedene Methoden zur Probenvorbereitung für eine Messung intrazellulärer Metaboliten in kultivierten tierischen Zellen. Grund für die große Anzahl verschiedener Methoden ist sicherlich, dass eine Anpassung der Methode an die jeweiligen Eigenschaften der Zellen aber auch des Messsystems erforderlich ist, aber auch dass verschiedene Metaboliten ein sehr unterschiedliches Extraktionsverhalten haben. Dies deutet ganz klar darauf hin, dass eine Methode sehr genau an die experimentellen Anforderungen angepasst werden muss, um eine verlässliche Messung zu ermöglichen.

Nichtsdestotrotz stellen *Metabolomic* bzw. *Metabolic Profiling* Ansätze sehr sensible Verfahren zur Charakterisierung von verschiedenen Kultivierungszuständen dar, da sich jeder Zustand in einem ganz individuellen Konzentrationsmuster äußert.

2 Motivation

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war, durch eine Quantifizierung intrazellulärer Stoffwechselprodukte einen Grundstein für einen verbesserten Einblick in die Abläufe des Metabolismus bzw. die Regulation von verschiedenen Stoffwechselwegen in tierischen Zellen zu legen.

Die Quantifizierung von intrazellulären Metaboliten erschien als besonders sensibler Indikator für verschiedene Einflüsse auf Zellen, da nicht nur direkte Effekte durch externe Einflussgrößen sich in diesen Messgrößen niederschlagen, sondern auch, da Metabolitkonzentrationen ein Resultat sämtliche regulatorische intrazelluläre Prozesse darstellen. Somit sollten in dieser Arbeit anhand verschiedener Kultivierungszustände Metabolitmuster identifiziert werden, welche als charakteristische metabolische Fingerabdrücke dienen könnten.

Um eine möglichst individuelle Antwort für verschiedene Stoffwechselzustände zu erhalten, erschien es erforderlich nicht nur einen oder wenige Metaboliten zu bestimmen, sondern mehrere Metaboliten mit zentraler Funktion im Stoffwechsel. Aus diesem Grund sollte ein *Metabolic Profiling* anhand von Intermediaten aus Glykolyse und Krebszyklus sowie von Nukleotiden erfolgen.

Der erste, zwingend erforderliche Meilenstein für die hier vorliegende Arbeit war die Etablierung einer Messmethode für die Quantifizierung von Stoffwechselprodukten aus dem Zentralstoffwechsel. Hierbei sollten möglichst viele Metaboliten aus dem Zentralstoffwechsel mit einer einzigen Methode simultan quantifiziert werden, aber diese Methode sollte trotzdem einen robusten, anwenderfreundlichen Routinebetrieb zulassen. Anhand von in der Literatur beschriebenen Methoden mit der in dieser Arbeit zu nutzenden Chromatographiesäule (AS11, Dionex) [31-34] sollte ein Verfahren basierend auf Anionen-Austausch Chromatographie (AAC) für die Bestimmung von organischen Säuren, Nukleotiden und verwandten Metaboliten entwickelt werden (s. Abschnitt 4.3.6). Es sollte hierfür eine Chromatographieanlage vom Typ Bio-LC DX320 (Dionex, s. Abschnitt 4.3.6) verwendet werden.

Als komplementäre Methode sollte eine Analyse von Zuckern, Zuckerphosphaten und verwandten Metaboliten auf einer CarboPac PA1-Säule (Dionex) mit gepulster amperometrischer Detektion etabliert werden, wie schon mehrfach in der Literatur beschrieben [34-38]. Die hierfür genutzte Anlage ist ein Typ Bio-LC DX600 (Dionex, s. Abschnitt 4.3.6).

Durch die Kombination der beiden Chromatographiemethoden sollte eine Aufklärung der intrazellulären Konzentrationen eines Großteils der Metaboliten aus der Glykolyse und dem Krebszyklus sowie von Nukleotiden in kultivierten tierischen Zellen realisiert werden.

Der zweite notwendige Meilenstein dieser Arbeit war die Identifizierung einer geeigneten Methode zur Probenvorbereitung für die Messung von intrazellulären Metaboliten. Trotz der zahlreichen Untersuchungen zur Extraktion von unterschiedlichen Stoffklassen aus verschiedenen Organismen (s. Abschnitt 3.4) konnte in der Literatur keine detaillierte Studie zur Probenvorbereitung für kultivierte tierische Zellen zu den Metaboliten des Zentralstoffwechsels gefunden werden. Wie aber die Literatur zu Hefen und Prokaryonten zeigte, ist eine genaue Charakterisierung und Optimierung

der Probenvorbereitung unerlässlich, wenn zuverlässig intrazelluläre Daten für *Metabolic Profiling* oder *Metabolomics* Studien gemessen werden sollen. Zusätzlich waren für die hier durchgeführte Arbeit spezielle Anforderungen zu berücksichtigen. Da das Interesse auf den Metaboliten des Zentralstoffwechsels lag, war die Probenvorbereitung für ein weites Feld von unterschiedlichen Stoffwechselprodukten zu optimieren. Weiterhin war die Methode insbesondere auf die Kultivierung adhärenter Zellen anzupassen. Ein weiterer relevanter Punkt für die Auswahl der Probenvorbereitung war der hohe Proteingehalt des Zellkulturmediums aufgrund des darin enthaltenen Serums. Explizit zu erwähnen ist als zusätzlicher kritischer Aspekt die Nutzung der AAC zur Quantifizierung der Metaboliten. Diese Chromatographiemethode setzt für eine längerfristige Nutzung einen relativ hohen Reinheitsgrad der Proben voraus. Weiterhin war der Einsatz der häufig genutzten Probenvorbereitungsmethode mit Perchlorsäure (PCS; s. Abschnitt 3.4.2) in Kombination mit einer AAC nicht möglich, da die vergleichsweise hohe Perchloratkonzentration in den Proben nach der Probenvorbereitung die Elution und Detektion erheblich stören. Zusätzlich waren für die spezielle Anwendung mehrere Fragen zur Durchführung offen, wie z. B. die Anpassung an das Kultursystem oder die Volumenverhältnisse der Extraktionsmittel. Da aufgrund der zahlreichen Einflussgrößen von einem erheblichen experimentellen Aufwand auszugehen war, erschien es erforderlich die Untersuchungen systematisch durchzuführen. Eine Versuchsplanung entsprechend statistischen Methoden erschien als eine plausible Vorgehensweise. Darüber hinaus bot die objektive Optimierung anhand von *Desirability*-Funktionen eine sinnvolle Vorgehensweise bei der Auswahl einer Extraktionsmethode an.

Im dritten Meilenstein dieser Arbeit war das Ziel, anhand der etablierten Methoden eine Charakterisierung von Zellkulturen unter verschiedenen Zuständen, wie z. B. bei Kultivierung in unterschiedliche Medien, zu erreichen. Grundsätzliche Fragen nach dem Verhalten der Metabolitkonzentrationen während einer *Batch*-Kultivierung, wie z. B. ob starke Änderungen durchlaufen werden oder ob eine Homöostase vorliegt bzw. welche Einflüsse von verschiedenen Medien bzw. Medienkomponenten herrühren, sollten geklärt werden. Weiterhin sollte die Dynamik des Stoffwechsels anhand der Konzentrationen verschiedener Stoffwechselprodukte genauer untersucht werden. Zuletzt waren Konzepte zur Auswertung und Darstellung der großen Datenmengen zu erarbeiten.

Somit umfasste die Aufgabenstellung sowohl die Entwicklung einer Chromatographiemethode und einer Probenvorbereitungsmetode, die Anwendung der etablierten Methode als auch die Auswertung und Interpretation der gewonnenen Daten.

3 Theoretische Grundlagen

In der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik am Max-Planck-Institut in Magdeburg wird seit Jahren eine detaillierte Charakterisierung und Optimierung von zellkulturbasierten Impfstoffherstellungsverfahren angestrebt. Unter anderem werden hierfür MDCK- und Vero-Zellen eingesetzt. Ein Gesichtspunkt mit zentraler Bedeutung für die untersuchten Prozesse ist der Stoffwechsel dieser Zellen.

3.1 Stoffwechsel tierischer Zellen in Kultur

Im Vergleich zu Zellen in Geweben ist der Stoffwechsel von kultivierten tierischen Zellen deutlich verändert [39-47]. Dies äußert sich meist in einer hohen Aktivität der Glykolyse. Auch unter vollständig aeroben Bedingungen führt dies zu einem hohen Verbrauch von Glucose und einer Freisetzung großer Mengen Lactat. Außerdem dient Glutamin oft nicht nur als Stickstoff- sondern auch als zusätzliche Energiequelle, wodurch hohe Konzentrationen des Abbauproduktes Ammonium im Zellkulturüberstand akkumuliert werden. Beide hier genannten Endprodukte haben für viele Zelllinien einen negativen Effekt auf das Zellwachstum [41, 48-51] und zusätzlich werden Produktivität [48, 52, 53] und Qualität der Produkte oft negativ durch diese Abbauprodukte beeinflusst [9, 54]. Als ursächlich für den veränderten Stoffwechsel bei schnell proliferierenden Zellen werden verschiedene Mutationen im Genom dieser Zellen angesehen [40, 46, 55, 56]. Ob ein Zweck des veränderten Stoffwechsels existiert oder wie weit es sich hier nur um einen Nebeneffekt der veränderten Zellbiologie handelt, ist bisher jedoch unklar.

Da das Zellwachstum äußerst eng mit dem Stoffwechsel verknüpft ist, wird hier kurz eine für adhärente Zellen (wie in dieser Arbeit verwendet) typische Wachstumskurve erläutert. Abbildung 3-1 zeigt schematisch eine Wachstumskurve bei linearer (A) und logarithmischer (B) Auftragung der Zellzahl.

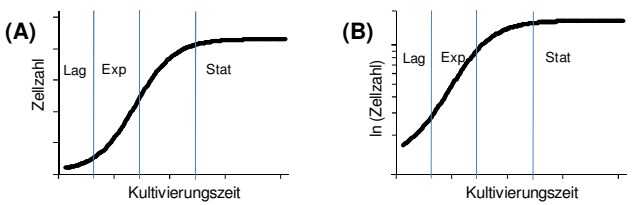


Abbildung 3-1: Schema des Zellwachstums von adhärenten Zellen in (A) bei linearer Darstellung der Zellzahl und (B) bei logarithmischer Auftragung.
Die vertikalen, blauen Linien deuten die Grenzen der entsprechenden Wachstumsphasen an. Lag: Lag-Phase; Exp: Exponentielle Phase; Stat: Stationäre Phase.

Typischerweise erfolgt die Einsaat von adhärenten Zellen nach Ablösung der Zellen aus der Vorkultur in suspendiertem Zustand. Je nach Kultursystem und Zelllinie heften sich die Zellen anschließend mit unterschiedlicher Effizienz an. Nach der Anheftung erfolgt meist eine Lag-Phase mit einer niedrigen Wachstumsrate. Diese Phase ist durch die Anpassung der Zellen an die neuen Kultivierungsbedingungen geprägt. Anschließend folgt das exponentielle Wachstum mit der

maximalen Teilungsrate. Der zeitliche Bereich dieser Phase ist typischerweise bei logarithmischer Auftragung als linearer Bereich zu erkennen (s. Abbildung 3-1 (B)). Nach dem exponentiellen Wachstum schließt sich ein Bereich mit eingeschränktem Wachstum an. Hauptursache für diese Einschränkung ist bei adhärenten Zellen die Limitation der Wachstumsfläche. Abschließend wird die stationäre Phase durchlaufen. Die Zellen sind in dieser Phase im konfluenten Zustand und keine weitere Vermehrung findet statt. Während Suspensionszellen gegen Ende einer *Batch*-Kultivierung die Absterbephase durchlaufen, ist für adhärente Zellen diese Phase meist nicht in großem Ausmaß bzw. sehr spät zu verzeichnen. Je nach Phase des Zellwachstums ist typischerweise der Stoffwechsel angepasst. Dies bedeutet, dass z. B. während des exponentiellen Wachstums eine höhere Aktivität vorliegt als in der stationären Phase.

Auf eine generelle Erläuterung des Zentralstoffwechsels sei hier verzichtet und auf die Literatur verwiesen [10, 11]. Der spezielle Fall des Stoffwechsels von kultivierten tierischen Zellen wird in den folgenden Abschnitten kurz erklärt [40, 45, 47]. Da der Stoffwechsel von kultivierten tierischen Zellen dem von krebsartigen Zellen stark ähnelt, wurde auf einige Literaturstellen zum Stoffwechsel von Krebszellen zurückgegriffen. Ein Schema einiger wichtiger Stoffwechselwege des Zentralstoffwechsels für tierische Zellen in Kultur ist in Abbildung 3-2 gegeben.

Gängige Energiequellen für tierische Zellen in Kultur sind Zucker und Aminosäuren, wobei in Zellkulturmedium am häufigsten Glucose und Glutamin zum Einsatz kommen. Der Abbau der Glucose erfolgt typischerweise über den Stoffwechselweg der Glykolyse, wobei Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, von vielen kultivierten Zelllinien zum Großteil in reduzierter Form als Lactat abschließend ausgeschieden wird. Der Abbau von Glutamin erfolgt häufig durch Desaminierung bzw. Transaminierung und anschließend kann die resultierende organische Säure α-Ketoglutarat zum Teil oder vollständig zu CO_2 und H_2O abgebaut werden.

Der Ablauf chemischer und biochemischer Reaktionen ist grundsätzlich von der Thermodynamik bestimmt. Je nach Reaktionsgleichgewicht und Konzentration der Substrate und Produkte findet tatsächlich eine Umsetzung statt, oder die Rückreaktion läuft ab. Die in Abbildung 3-2 dargestellten Reaktionsrichtungen spiegeln tendenziell das Lehrbuchwissen wider [10, 11]. Dies bedeutet, dass Reaktionen mit unidirektionalen Pfeilen zum Großteil in die angezeigte Richtung ablaufen, wobei Reaktionen mit einem bidirektionalen Pfeil in beide Richtungen ablaufen. Die Richtung der Pfeile berücksichtigt sowohl die Reaktionsgleichgewichte als auch die bekannten Konzentrationen der Edukte und Produkte. Enzyme in ihrer Funktion als Katalysatoren haben keinen Einfluss auf die Reaktionsrichtung, sondern setzen lediglich die Reaktionsgeschwindigkeit herauf. Eine weitere Gruppe von funktionellen Einheiten im Stoffwechsel stellen Transporter dar. Diese Proteine vermitteln den Austausch oder den, mitunter Energie getriebenen, Transport von Metaboliten zwischen der Zellumgebung und dem Cytosol, aber auch zwischen dem Cytosol und den verschiedenen Zellkompartimenten. Der Übersichtlichkeit wegen wurde auf die Darstellung von Transportern in Abbildung 3-2 verzichtet.

Zu berücksichtigen ist, dass das Wissen zu den dargestellten Stoffwechselwegen aus unterschiedlichsten Geweben bzw. Organismen zusammengetragen ist. Somit spiegelt dieses Stoffwechselschemas zwar den Stand des Wissens wider, ob aber alle dargestellten Stoffwechselwege tatsächlich wie beschrieben für tierische Zellen in Kultur ablaufen, kann im Detail nicht beantwortet werden.

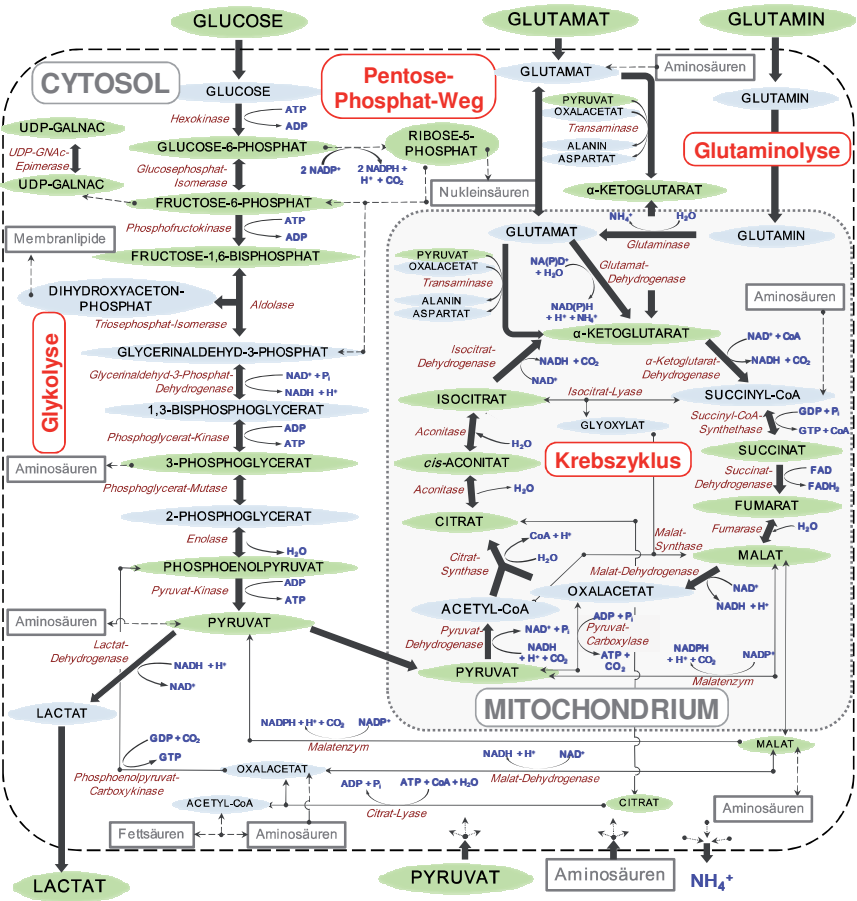


Abbildung 3-2: Schema wichtiger Stoffwechselwege des Zentralstoffwechsels für tierische Zellen in Kultur.

Schwarze Schrift, farblich hinterlegt: Stoffwechselintermediate (mit Ausnahme von Nukleotiden; grün: in dieser Arbeit gemessene Metaboliten); rote Schrift, kursiv: Enzyme; blaue Schrift: zusätzliche reaktionsteilnehmende Metaboliten; fette, dunkelgraue Pfeile: Reaktionen der Glykolyse, des Krebszyklus und der Glutaminolyse; dünne, schwarze Pfeile: anaplerotische Reaktionen; dünne, gestrichelte, schwarze Pfeile: Zusammenfassung mehrerer Reaktionen; Punktpfeile: von oder zu diversen Reaktionen; unidirektionale Pfeile: Reaktionen, welche zum Großteil in eine Richtung stattfinden; bidirektionale Pfeile; Reaktionen, welche in zwei Richtungen ablaufen.

3.1.1 Glucosestoffwechsel

Der Abbau von Glucose in kultivierten tierischen Zellen erfolgt großteils durch die Glykolyse [22, 57-59]. Neben der Funktion der Energiegewinnung ist die Glykolyse ein wichtiger Lieferant von Bausteinen für Synthesereaktionen, wie z. B. Aminosäuren für die Proteinsynthese oder Glycerol-3-Phosphat für die Synthese von Phospholipiden. Auch der für anabole Prozesse wichtige Abbau von Glucose über den Pentose-Phosphat-Weg hat seinen Ausgang in Glucose-6-Phosphat (G6P) und die daraus resultierenden Produkte Fructose-6-Phosphat (F6P) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) fließen wieder in die Glykolyse ein. Für viele kultivierte Zelllinien bzw. krebsartige Zellen ist der Fluss durch die Glykolyse erhöht, was direkt auf eine erhöhte Aktivität der Enzyme der Glykolyse zurückzuführen ist [45, 55, 56]. Dies wiederum wird begründet mit einer erhöhten Expression der Enzyme der Glykolyse und einem veränderten Muster der Isoenzyme [56]. Unter anderem wurde auch vermutet, dass die Phosphorilierung der Glykolyseenzyme durch mutierte Proteinkinasen beeinflusst ist [47].

Der erste Schritt bei dem Abbau von Glucose ist der Transport des Substrates in das Cytosol der Zelle. Bei den meisten industriell relevanten Zelllinien handelt es sich hier um einen vermittelten Diffusionsprozess. Der Vermittler ist typischerweise einer der Transporter aus der GLUT-Klasse [60-62], wobei die treibende Kraft bei der Aufnahme der Glucosegradient über die Zellmembran ist. Auch für MDCK-Zellen werden diese Transporter beschrieben [63, 64]. Alternativ kommt ein Symportprozess (Na^+) beim Import der Glucose für manche Zelllinien vor [40]. Typischerweise ist der Transportprozess der Glucose in die Zelle aber nicht der limitierende Prozess für die Glykolyserate [40, 58, 59].

Nach dem Transport der Glucose in die Zelle findet die Phosphorylierung zu G6P durch das Enzym Hexokinase (*Enzyme Commission* (EC) Nummer 2.7.1.1) statt, wobei Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) umgesetzt wird. Für viele Zelllinien weist diese Enzymreaktion eine niedrige Aktivität auf und stellt somit einen der limitierenden bzw. regulierten Schritte der Glykolyse dar [43, 58, 59, 65-67]. Dieses Enzym scheint bei kontinuierlichen Zelllinien eine wichtigere Rolle bei der Regulation der Glykolyse zu spielen als für Primärkulturen [59]. Die Regulation dieses Enzyms auf metabolischer Ebene findet durch eine Rückkopplungshemmung durch das Produkt G6P statt. Insbesondere eine an Mitochondrien gebundene Variante der Hexokinase scheint bei Tumorzelllinien und auch anderen kontinuierlichen Zellen eine wichtige Rolle zu spielen [40].

Der darauf folgende Reaktionsschritt der Glykolyse ist die Isomerisierung von G6P zu F6P durch das Enzym Glucosephosphat-Isomerase (EC 5.3.1.9). Dieses Enzym wurde allgemein als sehr aktiv und die Reaktion als reversibel beobachtet. Sowohl G6P als auch F6P spielen eine wichtige Rolle für die Glykosylierung von Proteinen, da diese Metaboliten als Vorläufer von UDP-aktivierten Hexosen dienen [9].

Im nächsten Schritt der Glykolyse wird F6P unter dem Verbrauch von ATP in Fructose-1,6-Bisphosphat (F16bP) umgesetzt. Diese Reaktion wird katalysiert durch das Enzym Phospho-fructokinase (EC 2.7.1.11) und ist thermodynamisch nahezu irreversibel. Für viele Gewebearten

und Zelllinien spielt dieses Enzym eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Glykolyse [10, 11]. Die Phosphofructokinase wird durch ATP allosterisch gehemmt, wobei dieser Effekt durch hohe Konzentrationen an Adenosinmonophosphat (AMP) aufgehoben werden kann. Ein weiterer regulatorischer Effekt ist die pH-Abhängigkeit dieses Enzyms, was bedeutet, dass bei einem niedrigen pH-Wert, die Aktivität des Enzyms vermindert ist. Durch Citrat wird eine Hemmung der Phosphofructokinase bewirkt. Als Aktivator ist Fructose-2,6-Bisphosphat zu nennen. Dieser Metabolit erhöht durch einen allosterischen Effekt die Affinität der Phosphofructokinase zu dem Substrat F6P. In diversen Untersuchungen mit schnell proliferierenden Zellen konnte die Phosphofructokinase durch unterschiedlichste Formen der Stimulation aktiviert werden, wie z. B. Infektion mit Tumorviren oder die Zugabe von Serum bzw. Wachstumsfaktoren [67].

Im nächsten Schritt der Glykolyse wird F16bP in einer reversiblen Reaktion durch das Enzym Aldolase (EC 4.1.2.13) in Dihydroxyaceton-Phosphat (DHAP) und GAP gespalten. Diese beiden C3-Körper können durch das Enzym Triosephosphat-Isomerase (EC 5.3.1.1) reversible ineinander überführt werden. DHAP kann zu Glycerin-3-Phophat umgesetzt werden und ist somit ein wichtiger Vorläufer für die Synthese von Phospholipiden. GAP wird in der nächsten Reaktion der Glykolyse unter Verwendung von anorganischem Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat umgesetzt. Diese reversible Reaktion wird durch die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12) katalysiert, wobei die oxidierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) reduziert wird. Durch das Enzym Phosphoglycerat-Kinase (EC 2.7.2.3) wird ein Phosphatmolekül von 1,3-Bisphosphoglycerat auf ADP übertragen, wobei 3-Phosphoglycerat (3PG) und ATP entstehen. Der Metabolit 3PG dient auch als Ausgangspunkt für die Synthese der Aminosäuren Serin und Glycin. Durch die Phosphoglycerat-Mutase (EC 5.4.2.1) wird 3PG reversibel in 2-Phosphoglycerat (2PG) umgesetzt. Anschließend wird 2PG durch Abspaltung von Wasser in Phosphoenolpyruvat (PEP) umgesetzt. Auch bei dieser durch die Enolase (EC 4.2.1.11) katalysierten Reaktion handelt es sich um eine reversible Umsetzung.

Im abschließenden Schritt der Glykolyse wird von PEP eine Phosphatgruppe auf ADP durch das Enzym Pyruvat-Kinase (EC 2.7.1.40) übertragen. In dieser regulierten Reaktion entsteht das Endprodukt der Glykolyse Pyruvat und ATP. Verschiedene Effektoren beeinflussen die Aktivität der Pyruvat-Kinase. Während ATP und Alanin die Reaktionsgeschwindigkeit herabsetzen, führt F16bP, AMP und das Substrat PEP selbst zu einer Beschleunigung der Umsetzung zu Pyruvat. Auch eine Inhibierung durch Acetyl-CoA ist bekannt. Dieser letzte Schritt wird allgemein neben der Hexokinase und der Phosphofructokinase als weiterer, den Fluss der Glykolyse regulierender Schritt betrachtet. Allerdings scheint bei Lymphocyten [68] und auch verschiedenen kontinuierlichen Zelllinien [58, 59, 65], die Pyruvat-Kinase deutlich aktiver vorzuliegen als die beiden anderen regulierten Enzyme Hexokinase und die Phosphofructokinase.

Um eine dauerhafte Glykolysetätigkeit aufrecht zu erhalten, ist eine Oxidation des durch die Glykolyse entstandenen $NADH + H^+$ (reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) erforderlich. Theoretisch könnte cytosolisches $NADH + H^+$ über einen der möglichen Shuttle-Systeme (Glycerin-Phosphat; Malat-Aspartat; Malat-Citrat) in die Mitochondrien transportiert

werden, um dort über die Atmungskette oxidiert zu werden. Für kontinuierliche Zelllinien findet dieser Weg allerdings nur in geringem Maße statt. Dies ist aber vermutlich nicht auf eine fehlende Aktivität der Shuttle-Systeme zurückzuführen [40]. Stattdessen wird insbesondere für kultivierte tierische Zellen oder Tumorzelllinien ein Großteil des in der Glykolyse erzeugten Pyruvats und NADH + H^+ durch die Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27) zu Lactat und NAD^+ umgesetzt. Dieses Enzym zeichnet sich durch eine hohe Aktivität in vielen untersuchten Zellen aus [45, 58, 59, 65, 68]. Lactat wird anschließend über einen Diffusionsprozess aus der Zelle geschleust.

Alternativ zu den ersten Schritten der Glykolyse kann die Glucose einen Abbau über den Pentose-Phosphat-Weg durchlaufen. Hierbei wird für die Biosynthese wichtiges NADPH + H^+ (phosphorylierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotids) erzeugt. Zusätzlich wird über diesen Stoffwechselweg Ribose-5-Phosphat (R5P) gebildet, welches zur Synthese von Nukleotiden und Nukleinsäuren dient [40, 42, 45]. Verglichen mit der Glykolyse wird allerdings für viele Zelllinien nur ein sehr geringer Anteil der aufgenommenen Glucose über diesen Stoffwechselweg abgebaut [22, 57-59, 69, 70]. In einigen Arbeiten mit Hybridoma und Myeloma-Zellen konnte jedoch gezeigt werden, dass deutliche Anteile der aufgenommenen Glucose über den Pentose-Phosphat-Weg abgebaut werden [71, 72].

Das durch die Glykolyse erzeugte Pyruvat kann über Pyruvat-Carrier in die Mitochondrien transportiert werden. Dort wird Pyruvat durch die Pyruvat-Dehydrogenase (EC 1.2.4.1) zu Acetyl-CoA umgesetzt. Eine Inhibierung dieses Enzymkomplexes kann durch ATP, Acetyl-CoA, NADH und langkettige Fettsäuren erfolgen. Dementsprechend findet eine Aktivierung durch AMP, NAD^+ und CoA statt. Eine weitere Ebene der Regulation stellt die Möglichkeit der Phosphorilierung dieses Enzyms dar. In kultivierten tierischen Zellen ist die Aktivität dieses Enzyms allerdings typischerweise niedrig und der Fluss gering [22, 57-59]. Auch für krebsartige Zellen scheint die Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase vermindert zu sein [55, 56]. Mitochondriales Acetyl-CoA kann über den Krebszyklus vollständig oxidiert werden und trägt so für viele Lebewesen essentiell zur Energiegewinnung bei. Der Krebszyklus liefert außerdem eine ganze Reihe von wichtigen Vorläufermetaboliten für unterschiedliche Synthesereaktionen.

Im ersten Schritt des Krebszyklus wird die Acetyl-Gruppe mit Oxalacetat durch die Citrat-Synthase (EC 4.1.3.7) verknüpft, wobei das Gleichgewicht dieser Reaktion klar auf der Seite von Citrat liegt. Inhibiert wird dieses Enzym unter anderem durch ATP, NADH, Acetyl-CoA und Citrat. Für verschiedene kontinuierliche Zelllinien konnte eine deutliche Aktivität dieses Enzyms nachgewiesen werden [58, 59, 72]. Anschließend wird Citrat reversibel durch die Aconitase (EC 4.2.1.3) zuerst in *cis*-Aconitat und danach in Isocitrat umgesetzt. Im nächsten Schritt des Krebszyklus wird Isocitrat durch das Enzym Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.41) oxidativ decarboxyliert, wobei α-Ketoglutarat entsteht. Diese Reaktion ist durch ATP und NADH inhibiert und durch ADP allosterisch aktiviert. Eine zweite oxidative Decarboxylierung folgt. In dieser durch die α-Ketoglutarat-Dehydrogenase (EC 1.2.4.2) katalysierten Reaktion wird α-Ketoglutarat zu Succinyl-CoA umgesetzt. Auch diese Reaktion ist stark reguliert. Succinyl-CoA und NADH hemmen dieses Enzym. Auf diese Reaktion folgt eine Umsetzung von Succinyl-CoA und GDP zu Succinat und

GTP. Katalysiert wird diese reversible Reaktion von der Succinyl-CoA-Synthetase (EC 6.2.1.4). In den nächsten drei Schritten wird Succinat zuerst durch die Succinat-Dehydrogenase (EC 1.3.5.1) zu Fumarat umgesetzt, anschließend erfolgt die durch die Fumarase (EC 4.2.1.2) katalysiert Addition von Wasser an Fumarat, wobei Malat entsteht. Abschließend wird Malat durch die Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.37) zu Oxalacetat oxidiert.

Der tatsächliche Ablauf der hier beschriebenen vollständigen Oxidation von Glucose durch den Krebszyklus konnte zwar für einige kultivierte Zellen gezeigt werden, dennoch wird für viele kontinuierliche Zellen der Großteil des aus der Glykolyse stammenden Pyruvats als Lactat ausgeschieden [22, 48, 57-59, 70, 73].

Weiterhin zu erwähnen ist der Stoffwechselweg der Gluconeogenese [10, 11]. Dieser Weg ermöglicht die Neusynthese von Glucose aus Substraten wie Pyruvat, Oxalacetat oder DHAP. Im Grund entspricht dieser Weg nahezu einer Umkehrung der Glykolyse. Der Großteil der Enzyme der Gluconeogenese ist identisch mit der Glykolyse mit Ausnahme der regulierten Enzyme Hexokinase, Phosphofructokinase und Pyruvat-Kinase. Die Bildung von PEP aus Pyruvat erfolgt durch die mitochondriale Synthese von Oxalacetat durch die Pyruvat-Carboxylase (EC 6.4.1.1), anschließender Reduktion zu Malat, Transport in das Cytosol, Oxidation zu Oxalacetat und zuletzt durch Decarboxylierung durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (EC 4.1.1.32). Der Schritt von F16bP zu F6P wird durch die Fructose-1,6-Bisphosphatase (EC 3.1.3.11) katalysiert. Der letzte Schritt erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum wobei G6P zu Glucose durch die Glucose-6-Phosphatase (3.1.3.9) umgesetzt wird. Die Gluconeogenese ist in allen Lebewesen zu finden. In Tieren läuft sie hauptsächlich in Lebergewebe statt, wurde aber auch in geringerem Maße im Cortex der Niere nachgewiesen. Im Falle einer Kultivierung von tierischen Zellen unter gängigen Bedingungen, also bei ausreichender Versorgung mit Glucose, spielt die Gluconeogenese keine Rolle im Stoffwechsel. Die Pyruvat-Carboxykinase konnte nicht in kontinuierlichen Zelllinien nachgewiesen werden [40]. Wie bereits erwähnt findet in Nierengewebe mitunter die Neusynthese von Glucose statt, allerdings ist der Stoffwechsel dieser Zellen stark verändert, was bedeutet, dass sie von Atmung und Gluconeogenese auf einen stark glykolytischen Stoffwechsel umschalten [74].

3.1.2 Glutaminstoffwechsel

Ein wichtiges Wachstumssubstrat für viele kultivierte tierische Zellen, aber auch krebsartiges Gewebe ist Glutamin [40, 55, 56, 75]. Neben der Funktion der Energiegewinnung werden durch den Glutaminstoffwechsel auch verschiedene Vorläufermetaboliten für Synthesereaktionen gebildet. Der Abbau von Glutamin kann über diverse Stoffwechselwege erfolgen. Die Aufnahme von Glutamin erfolgt über eines der Transportsyteme A, ASC (beide Na^+-Symport) oder L (Methionin-Antiport) [40]. Transformierte Zellen zeigen häufig eine erhöhte Aktivität des Systems A. Nach dem Import von Glutamin in die Zelle findet ein Transport in die Mitochondrien über einen neutralen Uniport-Carrier statt, wobei dieser Schritt vermutlich keine Limitation beim Abbau von Glutamin darstellt [40]. Der erste Schritt im Stoffwechsel von Glutamin ist eine Desaminierung durch das Enzym Glutaminase (Phosphat-Aktivierte-Glutaminase; EC 3.5.1.2), welches ausschließlich

mitochondrial vorliegt. Diese Reaktion resultiert in Glutamat und Ammonium. Die Aktivität der Glutaminase ist in vielen transformierten Zellen erhöht und wird durch die extrazelluläre Glutaminkonzentration beeinflusst. Glutamat kann in der Folge entweder eine Transaminierungsreaktion oder eine oxidative Desaminierung durchlaufen. Die Desaminierung, die ausschließlich in Mitochondrien stattfindet, wird durch die Glutamat-Dehydrogenase (EC 1.4.1.3) katalysiert und hat als Produkte α-Ketoglutarat und Ammonium. Zusätzlich wird NAD^+ zu NADH + H^+ reduziert (bzw. $NADP^+$ zu NADPH + H^+). Ammonium wird ausgeschieden und α-Ketoglutarat kann in unterschiedliche Stoffwechselwege einfließen, z. B. über den Krebszyklus vollständig abgebaut oder auch nach Decarboxylierung als Lactat ausgeschieden werden [40].

Die Transaminierung kann sowohl in Mitochondrien als auch im Cytosol ablaufen. Für den ersten Fall muss cytosolisches Glutamat über einen Glutamattransporter (Aspartat-Glutamat Antiporter oder Glutamat-Carrier) in die Mitochondrien gelangen. Beide Transporter sind an einen Protonentransport gekoppelt, so dass aufgrund des Protonengradienten der Fluss von Glutamat in die Mitochondrien überwiegt. Wenn Glutamat über den Aspartat-Glutamat Antiporter in die Mitochondrien transportiert wird, ist es erforderlich, dass Glutamat über das Enzym Aspartat-Transaminase (EC 2.6.1.1) abgebaut wird. Dabei wird Ammonium auf Oxalacetat übertragen und für jedes importierte Glutamat wird ein Aspartat produziert. Nur so kann weiterhin ein Antiport stattfinden. Für den Fall des Imports von Glutamat über den Glutamat-Carrier kann eine Desaminierung durch die Glutamat-Dehydrogenase ablaufen oder eine Transaminierung durch die Alanin-Transaminase (EC 2.6.1.2) bzw. die Aspartat-Transaminase [40].

Bei der Transaminierung von Glutamat im Cytosol kommen hauptsächlich die cytosolischen Varianten der beiden oben genannten Transaminasen zum Einsatz, was bedeutet, dass Ammonium auf Oxalacetat oder Pyruvat übertragen wird. Welches Substrat hierfür verwendet wird, ist abhängig von der Verfügbarkeit. In jedem Fall sind bei dem Abbau von Glutamin, neben den hier genannten Enzymen der Desaminierung bzw. Transaminierung und denen aus dem Krebszyklus, weitere Enzyme involviert. Bei diesen anaplerotischen Reaktionen sind insbesondere das Malat-Enzym (EC 1.1.1.40) und die bereits im Zusammenhang mit der Gluconeogenese erwähnten Enzyme Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und Pyruvat-Carboxylase zu nennen.

Grundsätzlich ist beim Abbau durch die Desaminierung mehr Energie für die Zelle zu gewinnen als bei der Transaminierung. Allerdings zeigte sich, dass der Großteil des ausgeschiedenen Ammoniums im Zellkulturüberstand für verschiedene kontinuierliche Zelllinien aus der Reaktion der Glutaminase stammt und somit die meisten Zellen eine Transaminierung durchlaufen [76]. Auch wenn für einige Zelllinien eine Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase gezeigt werden konnte, wurde jedoch meist kein Fluss durch diesen Stoffwechselweg detektiert [40, 76]. Auch für MDCK-Zellen konnte eine Aktivität dieses Enzyms nachgewiesen werden, auch wenn die Enzyme der Transaminierung eine deutlich höhere Aktivität aufwiesen [65]. Allerdings wurde für MDCK-Zellen weder für Aspartat noch für Alanin ein merklicher Anstieg der extrazellulären Konzentrationen während der Zellkultivierung gemessen [21], was andeutet, dass diese Aminosäuren keine Endprodukte der Glutaminolyse darstellen. Signifikante Flüsse durch sowohl den Desaminierungsweg

als auch die Transaminierungswege konnten für MDCK-Zellen per Metabolischer Stoffflussanalyse nachgewiesen werden [22]. Für verschiedene Zellen konnte insbesondere unter Glucoselimitation eine erhöhte Aktivität der Enzyme Glutaminase und Glutamat-Dehydrogenase gezeigt werden [40].

Grundsätzlich gibt es zahlreiche Möglichkeiten für den Abbau von Glutamin, wobei verschiedene Zelllinien unterschiedliche Reaktionswege bevorzugen. Zusätzlich können viele Zellen flexibel auf die Kultivierungsbedingungen reagieren und die Abbauwege dementsprechend anpassen.

Ein weiteres Enzym im Glutaminstoffwechsel ist die Glutamin-Synthetase (EC 6.3.1.2). Dieses Enzym ermöglicht die Synthese von Glutamin aus Glutamat. Für zahlreiche kontinuierliche Zelllinien konnte eine Aktivität dieses Enzyms nachgewiesen werden, auch wenn diese Aktivität meist deutlich niedriger war, als bei primären Zellen [59, 76, 77]. Während trotz Aktivität der Glutamin-Synthetase Hybridoma-Zellen nicht in glutaminfreiem Medium wachsen konnten [58, 59], konnten sich HeLa-Zellen ohne nachweisbare Aktivität dieses Enzyms in glutaminfreiem Medium vermehren. Auch CHO- und BHK-Zellen zeigten Wachstum in Zellkulturmedium ohne Glutamin, wobei bei diesen Zellen zumindest eine niedrige Aktivität der Glutamin-Synthetase zu finden war.

3.1.3 Pyruvatstoffwechsel

Neben den gängigen Substraten wie Zucker oder Aminosäuren wird vielen Zellkulturmedien auch Pyruvat zugesetzt. Für ein Wachstum auf verschiedenen Zuckern ist der Zusatz von Pyruvat für viele Zellen essentiell [67]. Für normale und transformierte embryonale Hamster-Fibroblasten wurde der Einfluss von Pyruvat auf das Zellwachstum und den Metabolismus untersucht. Hierbei zeigten sich verbesserte Wachstumseigenschaften wie auch eine verminderte Aufnahme von Glucose und Glutamin. Dem entgegen war für MDCK-Zellen keine signifikant veränderte Aufnahme von Glucose oder Glutamin bei Zusatz von Pyruvat zum Zellkulturmedium zu erkennen [21]. Bei weiteren Versuche von Genzel et al. konnte ein Zellwachstum für CHO-K1-, BHK- und MDCK-Zellen ohne Glutamin erreicht werden, indem dem Medium Pyruvat zugegeben wurde. Eine Hypothese zu den Effekten des Pyruvats ist, dass das Verhältnis aus $[NAD^+]$ zu $[NADH + H^+]$ durch eine Reduktion des Pyruvats verschoben werden könnte [67]. Durch eine Metabolische Stoffflussanalyse konnte gezeigt werden, dass eine effizientere Nutzung der Wachstumssubstrate vorliegt, wenn Glutamin durch Pyruvat im Zellkulturmedium ersetzt wird [22].

3.1.4 Weitere Wachstumssubstrate

Weitere Wachstumssubstrate neben Glucose, Glutamin und Pyruvat kommen in Frage [67]. Diverse Zucker, Aminosäuren und organische Säuren und andere C-Quellen können von vielen Zellen abgebaut werden. Insbesondere im Zusammenhang mit MDCK-Zellen ist Fructose als Ersatz von Glucose zu nennen, was in gleichen maximalen Zellzahlen bei deutlich verminderter Lactatausscheidung resultierte [78]. Auch erfolgreiche Perfusionskultivierungen konnten mit MDCK-Zellen und Fructose als Glucoseersatz durchgeführt werden [79]. Fructose wird in erheblich geringeren Mengen abgebaut als Glucose, da Fructose nicht als Energiequelle genutzt wird. Voraussetzung für das Wachstum der Zellen ist allerdings eine ausreichende Versorgung mit Glutamin oder Pyruvat.

Die Rolle von Fructose ist insbesondere für anabole Prozesse erforderliches R5P zu liefern, da dies aus z. B. Glutamin oder Pyruvat nicht gebildet werden kann [80, 81].

3.1.5 Gegenseitiger Einfluss der Glykolyse und der Glutaminolyse

Die Stoffwechselwege der beiden wichtigsten Substrate, Glucose und Glutamin, beeinflussen sich gegenseitig. Insbesondere für Hybridomazellen wurden zahlreiche metabolische Zustände nachgewiesen, unter welchen entweder der Abbau der Glucose von der Glutaminkonzentration abhängig war oder auch der Glutaminabbau beeinflusst war durch die Glucosekonzentration [82-85]. Aber auch zahlreiche andere Zelllinien wurden auf die gegenseitigen Einflüsse von Glucose- und Glutaminstoffwechsel untersucht [73, 86, 87]. Häufig ist bei Glucoselimitation eine Stimulierung der Glutaminoxidation aufgetreten [72, 84-87]. Ferner konnte für verschiedene Zelllinien gezeigt werden, dass in Medien, in welchen Glutamin durch Pyruvat ersetzt wurde, der Glucoseverbrauch vermindert war [21]. Weitere unterschiedliche und mitunter auch gegensätzliche Effekte wurden in der Vergangenheit für die beiden Substrate Glucose und Glutamin nachgewiesen. Ein Grund hierfür ist sicherlich in den unterschiedlichen verwendeten Zelllinien zu suchen [40, 47].

Noch zu erwähnen in diesem Zusammenhang ist der Einfluss von Glucose auf die oxidative Phosphorilierung in einem kurzen Zeitraum (< 1 h) nach einem Glucosepuls. In Tumorzellen konnte eine übergangsweise verminderte Zellatmung als Folge eines Glucosepulses gezeigt werden. Als Ursache wurde eine durch die hohe Glykolysegeschwindigkeit ausgelöste niedrige Konzentration von ADP und P_i ausgemacht. Durch diesen Mangel kann mitochondrial kein ATP erzeugt werden. Dieses Phänomen wurde in zahlreichen Arbeiten untersucht und ist unter dem Namen Crabtree-Effekt beschrieben [56, 88-90]. Für Hefen und Bakterien wurde ein ähnliches Phänomen beobachtet und ebenfalls Crabtree-Effekt benannt, allerdings wurde eine andere Ursache ermittelt. Es handelt sich hierbei um eine Katabolitrepression, was bedeutet, dass die Expression von gewissen katabolen Enzymen durch Glucose unterdrückt wird [91].

3.1.6 Nukleotidstoffwechsel

Nukleotide sind intrazelluläre Metaboliten mit außerordentlich wichtiger Bedeutung für den Stoffwechsel. Viele von ihnen nehmen an zahlreichen Stoffwechselreaktionen entweder als Substrat und/oder als Effektor der Reaktion teil [10, 11]. In ihrer Funktion als Cofaktoren in Redoxreaktionen sind vor allem NAD^+, $NADP^+$ und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) bzw. die entsprechenden reduzierten Formen zu nennen.

Ein weiteres Nukleotid von essentieller Bedeutung für alle lebenden Organismen ist ATP. Dieser Metabolit dient als Energieüberträger bzw. Energiedonor, aber auch in regulatorischer Hinsicht ist der Einfluss von Adenosinnukleotiden sehr wichtig. Verschiedene Verhältnisse von ATP zu ADP und AMP oder auch P_i wurden als maßgebend für die Aktivität zahlreicher Enzyme nachgewiesen [89]. Insbesondere die *Energy Charge* ([ATP]+½[ADP]) / ([ATP]+[ADP]+[AMP]) wurde in der Vergangenheit intensiv untersucht und es konnte gezeigt werden, dass dieses Verhältnis entscheidend die Regulation des Zentralstoffwechsels beeinflusst [92-94]. Ein Großteil der

biochemischen Prozesse in lebenden Organismen wird durch die Hydrolyse von ATP angetrieben, wobei ADP oder AMP entstehen. ATP kann unter anderem in der Glykolyse durch Substratkettenphosphorilierung regeneriert werden. Weiterhin wird ATP in den Mitochondrien durch Atmung gewonnen. Dabei wird intramitochondriales NADH + H^+ (bzw. FADH + H) oxidiert. Durch die Elektronentransportkette werden in einer Reihe von Redoxreaktionen Protonen in den Intermembranraum der Mitochondrien gepumpt. Diese Protonen können in der Folge dazu genutzt werden, die ATP-Synthase (EC 3.6.3.14) mit Energie zu versorgen, wodurch P_i auf ADP übertragen wird und so ATP entsteht. Durch Nukleosiddiphosphat-Kinasen (EC 2.7.4.6) kann ebenfalls ATP erzeugt werden. Dabei wird von einem anderen Nukleosidtriphosphat (z. B. GTP) ein Phosphatrest auf ein ADP übertragen. Eine weitere Möglichkeit ATP zu regenerieren ist die Reaktion von zwei ADP zu einem AMP und einem ATP. Diese Reaktion wird katalysiert durch die Adenylat-Kinase (EC 2.7.4.3). Diese beiden Reaktionen sind exemplarisch für eine ganze Reihe von Enzymreaktionen, bei welchen Phosphatgruppen von Nukleotiden durch Transferasen bzw. Kinasen (EC 2.7.4.x) übertragen werden. Somit sind neben den Adenosinnukleotiden auch die weiteren, an vielen Reaktionen beteiligten Guanosin- (GMP, GDP, GTP), Cytidin- (CMP, CDP, CTP) und Uridinnukleotide (UMP, UDP, UTP) von großer Bedeutung für den Stoffwechsel.

Zuckernukleotide spielen einerseits eine wichtige Rolle als Vorläufer für die Glykosylierung von Proteinen [9]. So ist z. B. die Verzweigung von Glykosylierungsstrukturen durch die Konzentrationen der Zuckernukleotide beeinträchtigt [9]. Andererseits konnte für kultivierte tierische Zellen ein direkter Zusammenhang zwischen Ammoniumkonzentration im Zellkulturüberstand und den intrazellulären Konzentrationen der Zuckernukleotide UDP-N-Acetyl-Glucosamin (UDP-GlcNAc) und UDP-N-Acetyl-Galactosamin (UDP-GalNAc) festgestellt werden. Durch die Erhöhung der intrazellulären Konzentration dieser beiden Zuckernukleotide könnte auch der wachstumsinhibitorische Effekt von Ammonium vermittelt sein, da diese Metaboliten auch regulatorische Proteine im Cytosol beeinflussen [95, 96]. Ausgangspunkt der Synthese dieser Metaboliten ist F6P. Durch das Enzym UDP-N-Acetylglucosamin-Epimerase (EC 5.1.3.14) stehen UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc im Gleichgewicht.

3.1.7 Experimentelle Strategien zur Verbesserung der Effizienz des Zentralstoffwechsels

Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, nutzen verschiedene Zelllinien zwar mitunter unterschiedliche Stoffwechselwege, ein einheitliches Muster zeigen aber nahezu alle industriell relevanten Zelllinien im Bezug auf eine starke Glykolyse- und Glutaminolysetätigkeit. Da die Glucose nur ineffizient genutzt wird, was bedeutet, dass keine vollständige Oxidation zu CO_2 und H_2O erfolgt, sind große Mengen an Glucose und Glutamin erforderlich, um den Energiebedarf zu decken. Beide Abbauprodukte, Lactat und Ammonium, sind für viele Prozesse nachteilig, weshalb in der Vergangenheit zahlreiche Strategien angewendet wurden, um die Akkumulation dieser Metaboliten im Zellkulturüberstand zu vermeiden. Mit Hilfe von verfahrenstechnische Ansätzen, wie z. B. *Fed-Batch* oder Perfusionsstrategien konnten die Konzentrationen der Abbauprodukte niedrig gehalten werden [97-99]. Neben dem Verdünnen bzw.

dem Entfernen der Abfallprodukte besteht die Möglichkeit, den Stoffwechsel der Zellen positiv zu beeinflussen. Durch kontinuierlich niedrige Konzentrationen von Glucose im Medium konnte die Effizienz des Glucoseabbaus erhöht werden, was zur Folge hatte, dass weniger Lactat ausgeschieden wurde und ein größerer Anteil der Glucose vollständig zu CO_2 und H_2O oxidiert wurde [42, 48, 84, 100-104]. Diese Adaption des Metabolismus zeigte Effekte auf sowohl transkriptorischer als auch translatorischer Ebene [105]. Andere Strategien befassten sich mit einer Medienoptimierung [21, 48, 77, 78, 106, 107]. In jüngerer Vergangenheit wurden molekularbiologische Methoden verwendet, um eine Verbesserung des Stoffwechsels zu erreichen [62, 108-111]. So wurde z. B. der Zuckertransport optimiert [62] oder die Pyruvat-Carboxylase erfolgreich überexprimiert [110, 111].

Grundsätzlich ist bei der Optimierung des zellulären Metabolismus ein empirisches Experimentieren möglich, allerdings ist biochemisches und molekularbiologisches Wissen für ein gezieltes Vorgehen hilfreich. Grundlage hierfür ist die genaue Untersuchung und Charakterisierung des Stoffwechsels der genutzten Zelllinie.

3.2 Möglichkeiten zur experimentellen Untersuchung des Zentralstoffwechsels

Die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Kenntnisse zum Zentralstoffwechsel von kultivierten tierischen Zellen wurden durch unterschiedlichste Methoden gewonnen. Zahlreiche frühe Versuche wurden mit Zellextrakten oder Gewebeextrakten durchgeführt. Auf diese Weise wurden viele zentrale Stoffwechselwege aufgeklärt und Stoffwechselintermediate identifiziert.

In vielen Experimenten mit kultivierten tierischen Zellen wurden radioaktive Substrate eingesetzt und die Radioaktivität in den unterschiedlichen Stoffwechselprodukten bzw. Endprodukten verfolgt (z. B. [68, 73, 86, 87]).

Ein weiterer essentieller Bestandteil der Aufklärung des Stoffwechsels von kultivierten tierischen Zellen wurde durch die Bestimmung von Enzymaktivitäten erreicht (z. B. [58, 59, 65, 66]). Insbesondere für die Untersuchung der Regulation von Stoffwechselwegen sind diese Daten von großer Bedeutung.

Im Zusammenspiel mit den Ergebnissen zu Enzymaktivitäten erwiesen sich die intrazellulären Konzentrationen von Stoffwechselintermediaten als erforderlich für die Bestimmung der Regulationsmechanismen von Enzymen. Eine Zusammenführung der Daten von Enzymaktivitäten und Metabolitkonzentrationen erfolgte auf mathematischer Ebene in Form der Metabolischen Kontrollanalyse. Die Theorie hierzu besagt, dass die Kontrolle des Flusses durch einen Stoffwechselweg nicht durch einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ausgeübt wird, sondern die Summe aller Enzyme kontrolliert, mit unterschiedlich großen Kontrollkoeffizienten, den Fluss [112, 113].

Zahlreiche Arbeiten befassten sich mit der Bestimmung von intrazellulären Nukleotidkonzentrationen in tierischen Geweben. Auch für kultivierte tierische Zellen wurden intrazelluläre Nukleotide insbesondere wegen ihres regulatorischen Einflusses bezüglich ihrer Konzentrationen und deren zeitlichen Konzentrationsverläufe untersucht [8, 25, 96, 114-117].

Großen Erkenntnisgewinn zum Stoffwechsel von kultivierten tierischen Zellen brachten zahlreiche Versuche im Zusammenhang mit Metabolischer Stoffflussanalyse. Unter der Annahme eines stationären Zustandes kann durch Bilanzierung der extrazellulären Konzentrationen und basierend auf einem stöchiometrischen metabolischen Netzwerk die intrazelluläre Flussverteilung zum Teil errechnet werden [22, 23, 100, 118, 119]. Eine Erweiterung dieser Art der Stoffwechselanalyse stellt die ^{13}C-Metabolische Stoffflussanalyse dar. Durch die Bereitstellung eines isotopenmarkierten Substrates kann bei der Analyse von intrazellulären Metaboliten auch im Fall von z. B. parallelen Stoffwechselwegen oder Rückreaktionen eine Flussverteilung ermittelt werden [71, 118, 120].

Ein gerade in kürzerer Vergangenheit stark wachsendes Forschungsfeld umfasst die Methoden *Metabolic Profiling*, *Metabolomics* bzw. *Metabonomics*. Während bei Studien zum *Metabolic Profiling* die Bestimmung von einigen Stoffwechselprodukten im Vordergrund steht, setzen sich die Arbeiten im Bereich des *Metabolomics* oder *Metabonomics* die Bestimmung aller in einem Organismus, einem Gewebe oder einer Körperflüssigkeit vorkommenden Metaboliten zum Ziel [121-126]. Aus verschiedenen Gründen wird eine Analyse des Metaboloms angestrebt. Ein Einsatz zum Auffinden von Biomarkern als diagnostisches Werkzeug im Zusammenhang mit diversen Krankheiten ist möglich. Auch für toxikologische Studien oder Untersuchungen zur Wirksamkeit von Arzneimitteln wurden Metabolomanalysen eingesetzt [121]. Insbesondere bei Pflanzen [127-133], aber auch Prokaryonten [134-137] und Hefen [138-141] wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, wobei die Ziele unter anderem die Aufklärung unbekannter Stoffwechselwege, die Diskriminierung unterschiedlicher Mutanten bzw. Phänotypen oder die Untersuchung der *in vivo* Kinetik von Enzymen oder Stoffwechselwegen war. Der Vorteil der Analyse des Metaboloms ist, verglichen mit Untersuchungen zum Genom, Transkriptom oder Proteom, dass diese Messgrößen ein Ausdruck sämtlicher biochemischer und molekularbiologischer Ereignisse sind und deshalb ein äußerst detailliertes Abbild des physiologischen Gesamtzustandes einer Zelle widerspiegeln. Die große Schwierigkeit bei diesen Daten stellt sicherlich die Komplexität dar, was sich in einer eingeschränkten Interpretierbarkeit äußert.

3.3 Chromatographische Analyse von intrazellulären Stoffwechselprodukten

Die Quantifizierung von intrazellulären Metaboliten kann auf unterschiedlichsten Wegen erfolgen. Neben chromatographischen Verfahren kommen häufig auch enzymatische Methoden, Kernresonanzspektroskopie (NMR), Massenspektrometrie (MS), Kapillarelektrophorese (CE)-Methoden oder eine Kombination dieser Methoden zum Einsatz. Verschiedenste Analysemethoden für intrazellulärer Metaboliten sind im Zusammenhang mit dem Fachgebiet *Metabolomics*, *Metabonomics* oder *Metabolic Profiling* angewendet und verbessert worden [122-126, 132, 142-146]. Eine sehr potente Methode zur Analyse von Metaboliten ist die Gaschromatographie gekoppelt an MS-Detektoren. Durch die hohe chromatographische Auflösung der Proben können viele Substanzen getrennt quantifiziert werden. Allerdings birgt diese Methode den Nachteil, dass eine Derivatisierung vieler Metaboliten erfolgen muss, da nur flüchtige Substanzen analysiert werden

können. In die Analyse von Metaboliten aus dem Zentralstoffwechsel mit Hilfe von Flüssigchromatographie, insbesondere der AAC, sei hier genauer eingeführt.

3.3.1 Ionen-Austausch-Chromatographie

Eine spezielle Art der Flüssigchromatographie [147-151] ist die Ionen-Austausch-Chromatographie [152-156]. Das grundlegende Prinzip der Flüssigchromatographie, wie auch der AAC, ist, dass sich die Probe zwischen einer stationären und einer mobilen (flüssigen) Phase verteilt und die Analyten unterschiedlich stark von der stationären Phase zurückgehalten werden. Typischerweise handelt es sich bei der stationären Phase um das Säulenmaterial, welches bei der AAC positive Ladungen trägt. Die Wechselwirkungen sind bei der Ionen-Austausch-Chromatographie im Wesentlichen elektrostatischer Natur. Dies setzt voraus, dass die Analyten geladen sind, also im dissoziierten Zustand vorliegen. Maßgeblich wird die Retention durch den pH-Wert und die Ionenstärke des Elutionspuffers beeinflusst.

Ein typisches Detektionsprinzip in der AAC ist die UV-Absorption. Für Substanzen, die nur eine geringe UV-Absorption aufweisen, bietet sich die Leitfähigkeit als alternatives Detektionsprinzip an. Allerdings führen ionische Elutionspuffer in der AAC im Falle einer Gradientenelution zu einer ansteigenden Basislinie. Eine deutliche Verbesserung der Leitfähigkeitsdetektion wurde durch die Einführung von Suppressoren erreicht [157]. Eine rasche Weiterentwicklung dieser Geräte und zahlreiche Anwendungen folgten [153], auch für die Analyse von organischen Säuren [158-161]. Diese Geräte sind normalerweise zwischen analytischer Säule und Detektor positioniert. Bewirkt wird die Ionensuppression durch einen Austausch der Kationen des Eluenten mit Protonen, welche sich mit den Hydroxidionen zu Wasser verbinden. Durch Wasser wird kein Signal am Leitfähigkeitsdetektor erzeugt [162], weshalb der Eluent keinen Einfluss auf die Detektion hat. Als weiteres Detektionsprinzip in der Ionen-Chromatographie gewann in den letzten Jahren besonders die Gepulste-Amperometrische-Detektion an Popularität [163-165]. Gerade für organische Moleküle wie Zucker oder Aminosäuren erwies sich diese Art der Detektion als besonders nützlich [19, 166, 167].

Neben den verbesserten Detektoren war die Einführung der elektrochemischen Eluentengeneration in der Ionen-Chromatographie ein großer Fortschritt in Bezug auf Anwenderfreundlichkeit und Reproduzierbarkeit [162, 168, 169]. Zur Erzeugung eines Eluenten für die AAC wird durch einen stark sauren Kationen-Austauscher Wasser gepumpt und an den Enden dieser Austauschersäule eine Spannung angelegt, wobei Anode am Säuleneingang und Kathode am Säulenausgang positioniert sind. Durch elektrolytische Reaktion wird das Wasser an der Anode zu Protonen und Sauerstoff zersetzt und an der Kathode zu Hydroxidionen und Wasserstoff gespalten. Auf ihrem Weg durch den Kationenaustauscher verdrängen die Protonen die Kationen des Austauschers und diese Kationen verbinden sich anschließend an der Anode mit den Hydroxidionen zu einer Lauge. Über die angelegte Spannung lässt sich letztlich die Konzentration der Lauge einstellen.

3.3.2 Flüssigchromatographie im Bereich *Metabolic Profiling*

In den letzten Jahren kamen Methoden der Flüssigchromatographie beim *Metabolic Profiling* häufig zum Einsatz. Dabei wurden besonders zwei Ziele verfolgt. Zum einen sollten intrazelluläre Nukleotide bestimmt werden, um z. B. regulatorische Einflüsse dieser Metaboliten auf zelluläre Vorgänge zu ermitteln. Zum anderen waren die Zwischenprodukte der Glykolyse oder des Krebszyklus im Fokus der Analysen. Für zahlreiche Organismen und Zustände wurde die Zusammensetzung der Nukleotidpools charakterisiert (s. z. B. [170]). Einige kürzlich veröffentliche Arbeiten befassten sich mit CHO-Zellen [171], Carcinoma-Zellen [172, 173], verschiedenen normalen oder Tumor-Zelllinien [174] oder auch mit Epithelzellen [175]. Als Erweiterung der Analyse von Nukleotiden wurden gelegentlich zusätzlich Zuckernukleotide mit erfasst. Gerade für tierische Zellen sind diese Metaboliten von Bedeutung als Vorläufer für die Glykosylierung von Proteinen. Mit unterschiedlichen Methoden und für verschiedene Organismen wurden Nukleotide und Zuckernukleotide analysiert [95, 96, 115, 135, 176-181]. Der Einsatz der AAC fand bei der Analyse von Nukleotiden mit Cohn (1949) [182] seinen Anfang und zahlreiche Anwendungen [170] folgten.

Neben der Nukleotidbestimmung wurde häufig ein *Metabolic Profiling* von Metaboliten aus Glykolyse und Krebszyklus durchgeführt. Konzentrationen von Glykolyseintermediaten wurden mit unterschiedlichen Methoden ermittelt, unter anderem auch mittels AAC [36, 183-185]. Andere Arbeiten befassten sich mit der Bestimmung von organischen Säuren aus dem Krebszyklus [33, 186-188].

Da aber in typischen Zellextrakten unterschiedlichste Metabolitklassen vorliegen, ist es sicherlich sinnvoll, keine Gruppierung einzuführen, sondern möglichst alle Metaboliten ähnlicher Konzentrationsbereiche zu berücksichtigen. Gerade für den Fall, dass die Detektion nicht selektiv ist (z. B. Leitfähigkeitsdetektion), besteht ansonsten eine große Gefahr der Fehlinterpretation der Chromatogramme. Extraktionsproben für die Analyse von intrazellulären Metaboliten sind in ihrer Zusammensetzung besonders komplex und somit stellt sich die Frage, wie gut die genutzte Analysemethode dies komplexe Probengemisch auflösen kann. Im Falle der AAC konnte Wittmann et al. (2005) sowohl organische Säuren als auch Zuckerphosphate in Hefen analysieren [139]. Zusätzlich zu diesen Metaboliten wurden von Groussac et al. (2000) noch Nukleotide mit zwei verschiedenen AAC-Methoden untersucht [34]. Bhattacharya et al (1995) charakterisierte Extrakte von *E. coli* mit einer AAC-Methode [31]. Gewebeextrakte wurden von Vogt et al. (1998) auf ihren Metabolitgehalt mittels AAC getestet, wobei etwa 25 verschiedene Metaboliten, wie z. B. Zuckerphosphate, Nukleotide und organische Säuren, in einem 70-minütigen Chromatographielauf getrennt wurden [32]. Die Literatur zeigt, dass die AAC eine Auflösung von Extraktionsproben liefert, die eine Analyse der wichtigsten und auch relativ hoch konzentrierten intrazellulären Metaboliten erlaubt.

3.3.3 Flüssigchromatographie kombiniert mit Massenspektrometrie-Detektion

Wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben, ist eine Analyse von relativ hoch konzentrierten Metaboliten aus dem Zentralstoffwechsel durch HPLC-Methoden mit UV- bzw. Leitfähigkeitsdetektion möglich. Allerdings zeigte sich im Zuge der allgemeinen Verbesserung der Analytik,

dass eine Vielzahl von Metaboliten, die deutlich niedriger konzentriert in Extraktionsproben vorliegen, nicht zu analysieren ist. Insbesondere Probleme der Koelution, aber auch der Sensitivität der Methoden sind hierfür ausschlaggebend. Aus diesem Grund finden mittlerweile MS-Detektoren große Anwendung in der Analyse solch komplexer Probengemische. Insbesondere im Feld *Metabolomics* scheint eine Analyse ohne MS-Detektor nahezu unmöglich [124, 125, 142, 145]. Eine häufig eingesetzte Methode ist LC-MS, auch in Kombination mit einer Elektrospray-Ionisierung (ESI; [29, 30, 189-192]). Es kamen *Reversed-Phase* Säulen [146, 171, 193-195], Nucleodex-OH-Säulen [136, 196, 197] und auch HILIC-Chromatographie zum Einsatz [198, 199]. Auch AAC gekoppelt an MS-Detektoren wurde genutzt [183, 200-202]. Ein grundsätzliches Problem, welches bei der Quantifizierung mit Hilfe eines ESI-MS-Detektors auftritt, ist die Ionensuppression, die direkt verbunden ist mit einer nicht-linearen Antwort des Detektors auf die Menge der Analyten. Dies bedeutet, dass typischerweise die Methode ESI-MS den Nachteil einer schlechten Quantifizierung [203-207] in sich birgt. Unabhängig davon ist häufig die MS-Detektion bei sehr komplexen Proben die einzige Möglichkeit selektiv einzelne Metaboliten zu detektieren.

Wie in diesem Abschnitt beschrieben, existieren zwar zahlreiche chromatographische Methoden die eine Quantifizierung von intrazellulären Metaboliten ermöglichen, jedoch bergen alle Methoden diverse Nachteile bzw. sind nur beschränkt einsetzbar. Insbesondere die speziellen experimentellen Voraussetzungen sind bei der Auswahl einer Methode zu berücksichtigen und diesbezüglich spielt die Probenvorbereitung eine große Rolle.

3.4 Probenvorbereitung zur Messung intrazellulärer Metaboliten

Zur Untersuchung von intrazellulären Stoffwechselproduktkonzentrationen bieten sich wie oben erwähnt diverse Möglichkeiten. Generell muss man zwischen invasiven und nicht invasiven Methoden differenzieren. Während z. B. NMR-Methoden eine Bestimmung ohne physikalische Zerstörung der Zellen ermöglichen, müssen für z. B. alle chromatographischen Verfahren die Zellen einer Probenvorbereitung unterzogen werden. Da in der hier durchgeführten Arbeit eine invasive Methode zum Einsatz kam, werden auch die theoretischen Betrachtungen darauf beschränkt. Ziel der Probenvorbereitung ist typischerweise, die relevanten Metaboliten quantitativ aus den Zellen zu gewinnen und sämtliche Kontaminationen, also alle Substanzen, die nicht von Interesse sind, gänzlich aus der Probe zu entfernen. Je nach Art, Anzahl und Konzentration der Metaboliten, die gemessen werden sollen, sind diese Ansprüche zu realisieren oder mitunter unmöglich. In den meisten Fällen müssen Kompromisse bei den Methoden eingegangen werden, da die Stoffwechselprodukte, die analysiert werden sollen, in ihren biologischen, chemischen bzw. physikalischen Eigenschaften zu unterschiedlich sind, oder die Kontaminanten den Metaboliten von Interesse zu ähnlich sind. Neben der Extraktionsmethode muss meist auch eine zur Probenvorbereitung passende Methode zur Quantifizierung der Metaboliten gefunden werden.

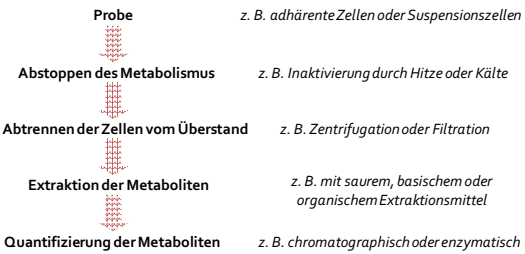


Abbildung 3-3: Schema für den Ablauf einer typischen Probevorbereitung für die Bestimmung von intrazellulären Stoffwechselprodukten in kultivierten tierischen Zellen; für jeden Schritt existieren mehrere mögliche Behandlungsmethoden.

Bei der Etablierung einer Extraktionsmethode ist neben den Eigenschaften der zu analysierenden Metaboliten die Art und der Zustand der Probe von großer Bedeutung. Allen voran müssen die Charakteristika des zu untersuchenden Organismus berücksichtigt werden, aber auch das Kulturmedium oder die Art der Kultivierung. Unterschiedlichste Proben wurden in der Vergangenheit in *Metabolic Profiling* Studien des Zentralstoffwechsels untersucht. So wurden unter anderem Prokaryonten [31, 184, 187, 196, 208], Hefen [202, 209-212] oder Pflanzen [131, 176, 200] analysiert. Für alle diese Proben wurden individuelle Probenvorbereitungen genutzt, wobei generell die zwei Hauptabschnitte (Abstoppen des Metabolismus; Extraktion der Metaboliten) der Probenvorbereitung berücksichtigen wurden, welche in den nächsten Abschnitten näher beschrieben werden.

3.4.1 Abstoppen des Metabolismus

Ein entscheidender Schritt bei der Probenvorbereitung zur Analyse intrazellulärer Metaboliten ist das Abstoppen des Stoffwechsels (metabolisches *Quenching*). Da verglichen mit dem Genom oder Proteom eine sehr hohe Dynamik im Metabolismus vorliegt, ist nach der Probennahme eine sofortige Unterbrechung der Stoffwechselaktivitäten zu gewährleisten, um eine Umsetzung von Metaboliten nach der Probennahme zu vermeiden. Solch eine Umsetzung würde zu einem artifiziellen Abbild der Metabolitkonzentrationen führen. Ein besonders häufig angewendetes Verfahren zum Abstoppen des Metabolismus, insbesondere bei Bakterien und Hefen, ist die Probennahme direkt in ein Gemisch aus gekühltem Methanol und Puffer (-40 bis -50 °C) [136, 196, 210, 211]. In den letzten Jahren wurde allerdings in einigen Arbeiten der Verdacht geäußert, dass diese Methode des Abstoppens zu einem Verlust von Metaboliten führen kann, insbesondere bei Prokaryonten [125, 134, 137]. Dass bei einer Probenahme in gepuffertes Methanol Metaboliten herausgelöst werden, belegen die Arbeiten von Maharjan und Ferenci (2003), die diese Methode als Extraktionsprotokoll für intrazelluläre Metaboliten für *E. coli* empfohlen [135]. Dies deutet an, dass höchstwahrscheinlich eine Permeabilisierung der Zellwand von *E. coli* durch gepuffertes Methanol stattfindet. Als alternatives Verfahren zum Abstoppen des Metabolismus wurde auch eine schnelle Zentrifugation genutzt [134, 137]. Im Falle von tierischen Zellen ist eine Anwendung von gepuffertem

Methanol zum Abstoppen des Metabolismus nicht möglich, da diese Zellen nur eine Zellmembran besitzen, die durch die Methode sofort zerstört würde. Für tierisches und pflanzliches Gewebe wird typischerweise flüssiger Stickstoff oder die Methode des *Freeze-Clamping* (Einklemmen der Probe zwischen zwei Metallplatten; [213]) zum schnellen Abkühlen genutzt [32, 200, 214-218]. Allerdings ist hier keine Trennung von extra- und intrazellulärer Flüssigkeit möglich. Das Abstoppen des Metabolismus von kultivierten tierischen Zellen wurde in der Vergangenheit häufig durch einen schnellen Kühlvorgang der Zellsuspension auf Eis, oder einen Waschschritt mit kaltem Puffer durchgeführt [174, 188, 215, 219]. Eine neue Methode zum schnellen Abkühlen von Zellen basierend auf einem Wärmeübertrager wurde von Wiendahl et al. (2007) entwickelt [220]. Nach dem Abkühlen erfolgt typsicherweise die Abtrennung der suspendierten Zellen vom Medium mittels Zentrifugation. Von Hofmann et al. (2008) wurde für Hepatozyten (HepG2-Zellen) ein Abstoppen des Metabolismus durch heiße Luft bewirkt [120]. Kürzlich wurde für CHO-Zellen ein erfolgreiches Abstoppen des Stoffwechsels durch Infusion der Probe in gekühltes (-40 °C) 60% Methanol supplementiert mit Ammoniumbicarbonat (0,85%) erreicht [221]. Eine weitere Möglichkeit wäre die Extraktion direkt nach der Probenahme, was aber keine Unterscheidung zwischen extra- und intrazellulären Metabolitkonzentrationen ermöglicht. Darüber hinaus sind gerade bei tierischen Zellen in Suspension die Zellkonzentrationen relativ niedrig, was Schwierigkeiten bei der Quantifizierung durch die großen Konzentrationsunterschiede zwischen den intra- und extrazellulären Metaboliten nach sich ziehen kann.

3.4.2 Extraktion

Verglichen mit dem relativ überschaubaren Feld der Abstopp-Methoden findet sich in der Literatur eine große Zahl verschiedener Vorgehensweisen zur Extraktion der Metaboliten. Für Bakterien und Hefen wurden in der Vergangenheit zur Extraktion unterschiedlichste Extraktionsmittel eingesetzt, wie z. B. Perchlorsäure (PCS), Ameisensäure, Natronlauge, verschiedene Detergenzien und organische Lösungsmittel [31, 184, 187, 196, 202, 208-212]. Aufgrund des großen Umfangs dieses Feldes sei hier nur explizit auf die Arbeiten von Maharjan und Ferenci (2003) [135] und Villas-Boas et al. (2005) [138] verwiesen, die mit dem Fokus einer Analyse des Metaboloms verschiedene Methoden zur Extraktion entsprechend für *E. coli* und Hefen untersuchten. Ein Überblick über verschiedene Vorgehensweisen zur Metabolitextraktion für Pflanzen ist von Fiehn (2002) [122] gegeben. Aufgrund der offensichtlichen Unterschiede zwischen Pflanzen und tierischen Zellen sei hier nicht weiter auf dieses Themengebiet eingegangen, sondern nur eine detailliertere Beschreibung der für tierische Zellen angewendeten Methoden gegeben. Ein grundlegender Unterschied zwischen pro- und eukaryontischen Zellen ist, dass Eukaryonten kompartimentiert sind. Typischerweise sind die Metabolitkonzentrationen in den unterschiedlichen Kompartimenten auch verschieden, aber aufgrund von technischen Schwierigkeiten berichten die meisten Arbeiten in der Literatur, und auch die hier vorliegende Arbeit, von Metabolitmengen, die den Durchschnitt der gesamten Zelle widerspiegeln. Bei einigen Arbeiten jedoch sollten Unterschiede zwischen den Kompartimenten geklärt werden [133, 218, 222-224]. Viele der frühen Studien befassen sich mit Konzentrationen von

Nukleotiden in Geweben oder auch Gewebekulturen [216-218, 222, 225-231]. Für die Extraktion wurde häufig PCS eingesetzt [225, 229-233]. Ein Standardwerk der Metabolitbestimmung [234] schlägt für einen Großteil der intrazellulären Nukleotide, aber auch anderer Metaboliten, eine Extraktion mit PCS vor, was die Qualität dieser Methode unterstreicht. In vergleichenden Studien wurden mehrere Methoden untersucht [217, 226, 228]. In kürzerer Vergangenheit wurden zu Produktionszwecken kultivierte tierische Zellen häufiger mit PCS oder Trichloressigsäure (TCS) extrahiert um Nukleotide zu quantifizieren [8, 25, 115, 116, 177, 181, 219, 235]. Grob et al. [236] hingegen schlägt als optimale Extraktionslösung organische Lösungsmittel mit einem wässrigen Anteil vor.

Die Analyse von Zuckerphosphaten aus tierischen Geweben oder kultivierten Zellen wurde in der Vergangenheit häufig mit PCS, TCS [237-239] oder Acetonitril (ACN) [193, 240-242] durchgeführt. Verschiedene Methoden zur Bestimmung von Zuckerphosphaten sind von Bergmeyer beschrieben [234].

Der Fokus einiger Arbeiten war auf der Bestimmung der Konzentration von organischen Säuren in tierischem Zellgewebe oder kultivierten tierischen Zellen. Auch hier sei wiederum auf die umfangreiche Methodensammlung von Bergmeyer [234] verwiesen. In weiteren Untersuchungen zu den Konzentrationen von organischen Säuren kam wiederum häufig PCS zum Einsatz, aber auch organische Lösungsmittel [33, 186, 188, 243].

Einige Arbeiten untersuchten aber auch mehrere Stoffklassen mit dem Ziel der Charakterisierung des Energiestoffwechsels von tierischen Zellen. So wurden z. B. organische Säuren, Zuckerphosphate und Nukleotide in Herzgewebe nach einer ACN-Extraktion gemessen [32] und in HeLa Zellen nach einer Extraktion mit PCS [86]. In einer Studie zur Untersuchung des Metaboloms in Gewebe wurde mit einer Extraktion basierend auf Methanol/Chloroform ($MeOH/CHCl_3$) gearbeitet [244]. Kürzlich analysierte Hofmann [120] Zuckerphosphate und organische Säuren inklusive der Isotopenverteilung nach Pulsexperimenten in Leberzellen mit dem Ziel einer Metabolischen Stoffflussanalyse. Die Extraktion erfolgte hierbei mit heißem Wasser.

Dieser Abschnitt zeigte, dass eine Vielzahl von Methoden zur Probenvorbereitung für eine Messung intrazellulärer Stoffwechselprodukte in der Literatur zu finden ist. Je nach Ziel der Analyse bzw. je nachdem, an welchen Metaboliten ein Interesse besteht, finden unterschiedliche Methoden Anwendung. Darüber hinaus ist besonders die Art der Probe von zentraler Bedeutung für die Auswahl einer geeigneten Probenvorbereitung. Dies bedeutet, dass für eine verlässliche Quantifizierung von intrazellulären Metaboliten eine Anpassung der Methode an die vorliegenden experimentellen Bedingungen erforderlich ist. Aufgrund der großen Anzahl an Einflussgrößen auf den Prozess der Probenvorbereitung ist eine systematische Vorgehensweise sinnvoll, um auf effizientem Wege eine geeignete Probenvorbereitung zu etablieren. In der hier vorliegenden Arbeit wurde hierfür auf statistische Versuchsplanung zurückgegriffen.

3.5 Grundlagen der statistischen Versuchsplanung

Eine Methode zur effizienten Planung von Experimenten basiert auf statistischer Versuchsplanung. [245-249]. Ein Vorteil der statistischen Versuchsplanung ist, dass im Vergleich zu herkömmlichen

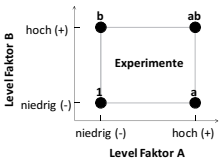
Arten der Versuchsplanung (Ein-Faktor-zu-einem-Zeitpunkt) weniger Ressourcen erforderlich sind, um Aussagen zur Signifikanz der Effekte von Einflussgrößen zu erhalten. Bei statistischer Versuchsplanung gibt es drei wichtige Prinzipien: Wiederholung, Randomisierung und Blockbildung. Bei der Auswertung kommen häufig graphische Methoden zum Einsatz. Weiterhin werden die Zusammenhänge zwischen Einfluss- und Zielgrößen oft durch empirische Modelle beschrieben. Basierend auf diesen Resultaten werden anschließend praktische Schlussfolgerungen gezogen und meist Folgeexperimente durchgeführt.

In vielen Experimenten sollen zwei oder mehrere Einflussgrößen (Faktoren) untersucht werden. Häufig ist hierfür die gängige Vorgehensweise eine Untersuchung jeder Einflussgröße zu jeweils einem Zeitpunkt (Ein-Faktor-zu-einem-Zeitpunkt-Experimente). Alternativ kann ein Experiment basierend auf statistischer Versuchsplanung, wie z. B. ein faktorieller Versuchsplan genutzt werden. Bei solch einem Versuchsplan werden in einem vollständigen Versuch alle möglichen Kombinationen der Faktoren und deren Niveaus (Levels) getestet. Die Faktoren werden somit in Abhängigkeit von einander untersucht. Allgemein ist zwischen Fix- und Zufallsfaktoren zu unterscheiden. Während Fixfaktoren frei vom Experimentator zu wählen (und fixieren) sind, werden bei Zufallsfaktoren die Proben zufällig aus einer größeren Population möglicher Niveaus gewählt. In der hier beschriebenen Arbeit handelt es sich ausschließlich um Fixfaktoren, weshalb sich auch die theoretischen Betrachtungen auf diese Art von Faktoren beschränken. Als weitere Unterscheidung sind kontinuierliche und diskrete Faktoren zu erwähnen. Während erstere quantitative Faktoren sind und prinzipiell unendlich viele Niveaus einer kontinuierlichen Skala annehmen können (z. B. Temperatur, Volumen), können diskrete Faktoren hingegen nur ganz bestimmte Werte annehmen. Man spricht hier auch mitunter von qualitativen Einflussgrößen (z. B. Hersteller, *Batch*, Gerätetyp).

3.5.1 Faktorielle Versuchspläne

Häufig genutzt werden faktorielle Versuchspläne. Ein Prinzip der faktoriellen Versuchsplanung ist die Orthogonalität. Dies bedeutet, dass jede Faktorstufenkombination gleich häufig untersucht wird, wodurch gewährleistet wird, dass der Versuchsplan ausgewogen ist. Dies ist für die Auswertung der entsprechenden Versuche wichtig. Beispielhaft ist ein Schema der durchzuführenden Experimente eines 2-Faktor-2-Level Versuchs in Abbildung 3-4 (A) und (B) in graphischer und tabellarischer (Matrix der unabhängigen Variablen) Form gezeigt. Für beide Faktoren gibt es in diesem Beispiel zwei zu untersuchende Niveaus (hoch bzw. + und niedrig bzw. -) und jedes Niveau des einen Faktors wird für beide Niveaus des anderen Faktors getestet. *I* steht für den Durchschnittswert des Experiments, *A* und *B* für die Haupteffekte und *AB* für den Interaktionseffekt. Die Plus- und Minuszeichen werden in diese Tabelle eingegeben, indem man entsprechend den Niveaus ein Plus für das hohe und ein Minus für das niedrige Niveau einsetzt.

(A)



(B)

Experiment	Einstellung	Faktorieller Effekt			
		I	*A*	*B*	*AB*
1	*1*	+	-	-	+
2	*a*	+	+	-	-
3	*b*	+	-	+	-
4	*ab*	+	+	+	+

Abbildung 3-4: Darstellung der Faktoreinstellungen für die vier durchzuführenden Versuche bei einem 2-Faktor-2-Level faktoriellen Experiment. (A) Graphisch; (B) Design Matrix.

Der Effekt einer Einflussgröße auf die Zielgröße ist definiert als die Änderung der Zielgröße bedingt durch die Änderung des Niveaus der Einflussgröße. Dieser Effekt wird auch Haupteffekt genannt. Berechnet wird der Haupteffekt durch Summenbildung der Werte der Zielgrößen bei dem hohen Level und ebenso bei dem niedrigen Level und anschließender Differenzbildung dieser beiden Summen. So wird für dieses Beispiel der Effekt von Faktor *A* berechnet nach:

$$A = \frac{1}{2n}(ab + a - b - (1)) \qquad \textbf{3-1}$$

Hierbei entspricht *A* dem Effekt von Faktor *A*, *n* ist die Anzahl der Wiederholungen bei diesen Einstellungen, *(1), a, b, ab* stehen für die Summe der Werte der Zielgröße aller *n* Wiederholungen bei den jeweiligen Einstellungen (s. Abbildung 3-4). Durch den Faktor ½ wird berücksichtigt, dass der Mittelwert für zwei Niveaus des anderen Faktors berechnet wird. Eine entsprechende Gleichung gilt für den Faktor *B*. Für die Berechnung des Durchschnittswerts *I* wird den Pluszeichen entsprechend die Summe aller Einzelwerte gebildet und anschließend durch vier (Anzahl der Versuche) geteilt.

Gelegentlich zeigen sich aber unterschiedliche Effekte auf die Zielgröße in Abhängigkeit von anderen Faktoren. In solch einem Fall spricht man von Interaktionseffekten. Der Effekt der Interaktion *AB* berechnet sich wie in 3-2 gezeigt.

$$AB = \frac{1}{2n}(ab + (1) - a - b) \qquad \textbf{3-2}$$

Diese Berechnung ergibt sich aus der Summenbildung der Werte der Zielgröße für die in Abbildung 3-4 (A) diagonal gegenüberliegenden Experimente und anschließender Differenzbildung. In den Gleichungen 3-1 und 3-2 sind die in den Klammern aufgeführten Berechnungen Kontraste, d. h. lineare Kombinationen von Parametern. So ist z. B. für 3-1 der $Kontrast_A = (ab+a-b-(1))$. Die Tabelle in Abbildung 3-4 (B) zeigt die Koeffizienten der Kontraste in den Spalten, d. h. die Tabelle ermöglicht eine einfache Berechnung der Kontraste. Die verschiedenen Experimente und deren Einstellungen sind in den Zeilen und die faktoriellen Effekte in den Spalten dargestellt. Alle weiteren Spalten werden durch Multiplikation der enthaltenen Haupteffekte berechnet. In dem hier gezeigten Fall ist der Effekt *AB* durch $A \times B$ berechnet. Bei *I* spricht man auch vom Identitätselement. Diese Spalte zeichnet sich dadurch aus, dass sie nur Pluszeichen enthält. Jede andere Spalte dieser Tabelle besitzt gleich viele Plus- und Minuszeichen. Die Tabelle stellt also

grundsätzlich dar, was in den Gleichungen 3-1 und 3-2 gezeigt ist, wobei die Vorzeichen in den Gleichungen den Einträgen in der Tabelle entsprechen. Die tabellarische Form der Darstellung ist insbesondere bei Versuchen mit vielen Faktoren hilfreich.

Typischerweise folgt der Berechnung der Effekte der Einflussgrößen und Interaktionen eine Visualisierung dieser Ergebnisse. Dafür können Diagramme erstellt werden, in welchen die Zielgröße über die Faktoren aufgetragen ist. Eine andere Form der Darstellung für kontinuierliche (quantitative) Faktoren beinhaltet ein Regressionsmodel der Form:

$$y = \mu + \sum_{j=1}^{k} \beta_j x_j + \sum_{i<j} \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \qquad \textbf{3-3}$$

Hierbei ist y die Zielgröße, μ ist der Mittelwert aller Messungen, x stellt die skalierten Level der Faktoren dar, β_j sind die zu schätzenden Haupteffektwerte und β_{ij} sind die zu schätzenden Interaktionseffektwerte und ε ist der Fehler. Die Skalierung der Level bedeutet, dass das niedrige Level als -1 und das hohe Level als +1 definiert sind. Die graphische Darstellung der Gleichung 3-3 führt zu einer Antwortoberfläche, wobei die beiden Faktoren auf der x- und y-Achse und die Zielgröße auf der z-Achse aufgetragen sind.

Als Vorteil von faktoriellen Versuchsplänen im Gegensatz zu Ein-Faktor-zu-einem-Zeitpunkt Experimenten wird die höhere relative Effizienz aufgeführt. Zum Beispiel erhält man für ein 2-Faktor-2-Level Experiment mit vier Einzelexperimenten für beide Faktoren je zwei Schätzwerte. Für zwei Schätzwerte bei zwei Faktoren in einem Ein-Faktor-zu-einem-Zeitpunkt Versuchsplan sind sechs Einzelexperimente nötig. Mit zunehmender Zahl von zu testenden Einflussgrößen nimmt die relative Effizienz von faktoriellen Designs deutlich zu. Für den Fall, dass eine Interaktion zwischen den beiden Faktoren besteht, kann dies mit einem faktoriellen Versuchsplan erkannt werden. Ein Ein-Faktor-zu-einem-Zeitpunkt Versuchsplan würde hier häufig zu Fehlinterpretationen führen bzw. die Interaktion nicht aufdecken.

Die Analyse von faktoriellen Experimenten schließt neben verschiedenen graphischen Methoden wie z. B. Kastendiagramme (*Box-Plots*) oder Streudiagrammen (*Scatterplots*) meistens die Methode der Varianzanalyse (ANOVA; *Analysis of Variance,* Varianzanalyse) ein. Durch diese Methode wird getestet, ob die Mittelwerte von verschiedenen Verfahren bzw. experimentellen Einstellungen signifikant unterschiedlich sind. Voraussetzungen hierfür sind, dass die Stichprobenvariablen normalverteilt sind und die Varianz homogen ist. Im Grunde wird bei diesem Vorgehen die Gesamtschwankung der Daten in einzelne Komponenten zerlegt.

$$FQS_{Gesamt} = FQS_{Gruppe} + FQS_{Fehler} \qquad \textbf{3-4}$$

FQS_{Gesamt} steht hier für den Wert der Quadratsumme der Abweichungen (Fehlerquadratsumme) der einzelnen Proben vom Gesamtmittelwert des Versuchs. FQS_{Gruppe} steht für die Quadratsumme der Abweichungen der Gruppenmittelwerte vom Gesamtmittelwert und FQS_{Fehler} steht für die Quadratsumme der Abweichungen der einzelnen Messungen einer Gruppe vom Gruppenmittelwert. Im einfachsten Falle soll entschieden werden, ob unterschiedliche Einstellungen eines Faktors

(unterschiedliche Gruppen) gleiche oder unterschiedliche Ergebnisse bewirken. Somit wird untersucht, ob die Varianz zwischen den verschiedenen Einstellungen größer ist als die Varianz innerhalb ein und derselben Einstellung. Die Signifikanz wird anhand der *F*-Verteilung überprüft. Eine Tabelle für eine ANOVA sieht typischerweise wie folgt aus:

Tabelle 3-1: Exemplarische Tabelle für die Varianzanalyse (ANOVA) für einen Versuch mit einem fixen (kontrollierten) Faktor.

Schwankungsquelle	**Fehlerquadratsumme** (FQS)	**Freiheitsgrade**	**Mittl. Fehlerquadrate** (MFQ)	$\mathbf{F_0}$
Zwischen den Gruppen	FQS_{Gruppe}	m-1	MFQ_{Gruppe}	$F_0=MFQ_{Gruppe}/MFQ_{Fehler}$
Innerhalb der Gruppe	FQS_{Fehler}	n-m	MFQ_{Fehler}	
Gesamt	FQS_{Gesamt}	n-1		

Anzahl der Proben: n; Anzahl der Gruppen: m

Für eine detaillierte Beschreibung sei auf die Literatur verwiesen [245-247, 250]. Im Falle eines Experiments mit mehreren Faktoren, wie zum Beispiel das oben erwähnte 2-Faktor-2-Level Experiment, wird jeder Faktor auf Signifikanz getestet. Dies bedeutet, dass für Faktor *A*, Faktor *B* und die Interaktion aus *A* und *B* je eine Fehlerquadratsumme berechnet wird.

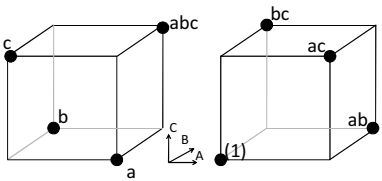
Neben vielen verschiedenen Möglichkeiten für faktorielle Versuchspläne kommt 2^k faktoriellen Designs eine besondere Bedeutung zu, da sie besonders häufig in der Forschung und Entwicklung angewendet werden. Weiterhin bilden sie oft die Grundlage für weitere Arten von Versuchsplänen. Screeningexperimente werden häufig gemäß 2^k-Versuchsplänen durchgeführt. Diese Versuchspläne ermöglichen die geringste Anzahl von Einzelexperimenten für k Faktoren. Da für jeden Faktor nur zwei Niveaus untersucht werden, wird angenommen, dass eine lineare Abhängigkeit der Zielgröße vorliegt. Für Screeningexperimente ist das häufig eine akzeptable Annahme. In der einfachsten Form eines 2^k faktoriellen Designs werden zwei Faktoren ($k = 2$), wie in Abbildung 3-4 als zweidimensionales Rechteck dargestellt, untersucht. Mit jedem zusätzlichen Faktor kommt eine weitere Dimension hinzu. Typischerweise untersucht man mit 2^k-Versuchsplänen die Größenordnung und Richtung des Effektes der Faktoren, um festzustellen, welche Faktoren für den Prozess relevant sind. Mit der Varianzanalyse werden die Hypothesen auf statistische Signifikanz überprüft.

3.5.2 Fraktionelle faktorielle Versuchspläne

Mit zunehmender Anzahl von Faktoren, die in einem 2^k-faktoriellen Experiment untersucht werden sollen, nimmt die Anzahl der Experimente für ein komplettes Experiment stark zu. Z. B. wären bei sechs Faktoren bereits 64 Einzelexperimente erforderlich, wobei nur ein Teil der Freiheitsgrade notwendig ist, um die Haupteffekte und die Effekte der 2-Faktor-Interaktionen zu schätzen. Im Falle der häufig gerechtfertigten Annahme, dass der zu untersuchende Prozess hauptsächlich durch Haupteffekte und Interaktionseffekte niedriger Ordnung beeinflusst wird, kann anstelle eines kompletten faktoriellen Versuchsplans nur ein Teil der Einzelexperimente durchgeführt werden. Hierbei spricht man von einem fraktionellen faktoriellen Versuchsplan. Diese Versuchspläne werden vor allem dann genutzt, wenn viele Faktoren zu untersuchen sind, aber nur von einigen ein maßgeblicher Einfluss auf den Prozess erwartet wird. In Folgeexperimenten können dann die als wichtig erkannten Faktoren genauer charakterisiert werden. Darüber hinaus finden fraktionelle

Versuchspläne vor allem dann Anwendung, wenn limitierte Ressourcen vorhanden sind bzw. um den Versuchsaufwand einzuschränken. Bei der Reduktion der Einzelexperimente muss allerdings gewissen Richtlinien gefolgt werden. Normalerweise werden fraktionelle faktorielle Versuchspläne gemäß der Gleichung 2^{k-p} deklariert. Während ein volles faktorielles Design mit drei Faktoren 2^3, also acht Einzelexperimente erfordert, sind für ein 2^{3-1} fraktionelles faktorielles Design nur vier Einzelexperimente nötig. Bei $p = 1$ handelt es sich um eine halbe Fraktion, bei $p = 2$ eine viertel Fraktion usw. Generell spricht man bei 2^{k-p} Designs von der $1/2^p$ Fraktion eines 2^k vollen fraktionellen Versuchsplans. Beispielhaft sind in Abbildung 3-5 die zwei halben Fraktionen eines 2^3 faktoriellen Versuchsplan in (A) graphisch und (B) tabellarisch gezeigt. Die Auswahl der ersten halben Fraktion erfolgte dadurch, dass man nur die Einstellungen wählte, die in der Spalte *ABC* ein Pluszeichen haben. Somit wird die Spalte *ABC* Designgenerator dieses fraktionellen faktoriellen Experiments genannt. Für diese Einstellungen gilt $I = ABC$, was auch als Definitionsbeziehung bezeichnet wird. Generell gilt, dass alle Spalten, die gleich der Identitätsspalte *I* sind, die Definitionsbeziehung darstellen. Für das oben gezeigte 2^{3-1} Experiment werden die drei verbleibenden Freiheitsgrade genutzt, um die drei Haupteffekte *A, B, C* zu schätzen.

(A)



(B)

	Einstellung	Faktorieller Effekt							
		I	*A*	*B*	*C*	*AB*	*AC*	*BC*	*ABC*
1.Fraktion	*a*	+	+	-	-	-	-	+	+
	b	+	-	+	-	-	+	-	+
	c	+	-	-	+	+	-	-	+
	abc	+	+	+	+	+	+	+	+
2. Fraktion	*ab*	+	+	+	-	+	-	-	-
	ac	+	+	-	+	-	+	-	-
	bc	+	-	+	+	-	-	+	-
	(1)	+	-	-	-	+	+	+	-

Abbildung 3-5: Graphische Darstellung der zwei halben Fraktionen eines 2^3 faktoriellen Versuchsplans (A); tabellarische Form mit den Kontrastkoeffizienten (Plus- und Minuszeichen) für die acht Experimente eines 2^3 Versuchsplans (B).

Aus der Tabelle in Abbildung 3-5 ist die Berechnung einfach zu ermitteln, indem man in der 1. Fraktion den Kontrast für *A* mit den entsprechenden Koeffizienten (Plus- bzw. Minuszeichen der Spalte *A*) ermittelt und mit ½ multipliziert (Gleichung 3-5). Der Faktor 1/*n* (s. Gleichung 3-1) entfällt typischerweise bei fraktionellen faktoriellen Experimenten, da keine Wiederholungsexperimente durchgeführt werden.

$$A = \frac{1}{2}(a - b - c + abc) \qquad \textbf{3-5}$$

Durch die Reduktion der Einzelexperimente ist allerdings diese Berechnung mit der Berechnung des Interaktionseffektes BC identisch, was heißt, dass 3-5 eigentlich den Effekt von $A + BC$ wiedergibt. Bei Effekten, die nicht zu trennen sind, spricht man von Aliassen, was eine Vermengung der Effekte dieser Faktoren gleichkommt. Dementsprechend sind die Effekte von *B* bzw. *C* mit den Interaktionseffekten von *AC* bzw. *AB* vermengt.

Die zweite, alternative Fraktion besitzt die Definitionsbeziehung $I = -ABC$. In diesem Fall werden die Effekte von $A - BC$, $B - AC$, $C - AB$ geschätzt. In der Praxis ist irrelevant, ob die erste oder zweite Fraktion genutzt wird, da beide Fraktionen zusammen ein komplettes 2^3 Experiment liefern. Beide Fraktionen untersuchen vier der acht Eckpunkte in Abbildung 3-5. Typischerweise werden fraktionelle faktorielle Versuchspläne auch mittels der sogenannten Auflösung charakterisiert. Das oben gezeigte Beispiel eines 2^{3-1} Experiment ist ein Versuch mit der Auflösung III, was der niedrigsten sinnvollen Auflösung entspricht. In solch einem Experiment sind die Haupteffekte vermengt mit den 2-Faktor-Interaktionen, aber nicht mit anderen Haupteffekten. Auflösung IV bedeutet, dass Haupteffekte keine Aliasse besitzen, 2-Faktor-Interaktionen allerdings teilweise Aliasse voneinander sind. In Auflösung V Experimenten sind 2-Faktor-Interaktionen nur mit 3-Faktor-Interaktionen vermengt [246-248].

3.5.3 *Central Composite* Versuchspläne

Häufig schließt sich an ein Screening der Faktoren eine genauere Charakterisierung der verbleibenden Einflussgrößen an. Dies bedeutet, dass die nun untersuchten Einflussgrößen auf meist mehr als zwei Niveaus getestet werden und dadurch eine Beschreibung des wahren Zusammenhangs eher erreicht werden kann. Da die tatsächliche Abhängigkeit der Zielgröße von den Einflussgrößen sich eher selten durch einen linearen Zusammenhang abbilden lässt, werden häufig quadratische Effekte mit in das Modell aufgenommen.

$$y = \mu + \sum_{j=1}^{k} \beta_j x_j + \sum\sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{j=1}^{k} \beta_{jj} x_j^2 + \varepsilon \qquad \textbf{3-6}$$

Für die Erklärung der Variablen sei auf Gleichung 3-3 verwiesen. Zusätzlich ist hier β_{jj} aufgeführt, was den Schätzwerten für die quadratischen Effekte entspricht. Um ein solches Modell sinnvoll anpassen zu können, sind allerdings mehr als zwei Niveaus für die Faktoren zu untersuchen. Eine gängige Lösung dieses Problems ist die Erweiterung eines 2^k faktoriellen Experiments mit 2k Sternpunkten (weiter außerhalb des durch die faktoriellen Punkte untersuchten Bereichs) und mit einem Zentrumspunkt (in der Mitte des untersuchten Bereichs). Abbildung 3-6 zeigt die Anordnung der Einzelexperimente für einen entsprechenden Versuchsplan mit zwei Faktoren. Solch ein experimenteller Plan wird *Central Composite* Design genannt und ist oft genutzt um Modelle 2. Ordnung anzupassen.

Die Sternpunkte befinden sich jeweils auf den Niveaus 0 für den einen und α für den anderen Faktor, wobei α idealerweise so gewählt wird, dass die Orthogonalität des Designs bewahrt wird. Zusätzlich ist es empfehlenswert, dass eine Drehbarkeit des Versuchsplans möglich ist. Dies bedeutet, dass alle Versuchspunkte den gleichen Abstand vom Zentrumspunkt haben. Diese Eigenschaft ist wichtig, da so die Varianz der Schätzwerte für alle (gleichweit entfernten) Punkte als gleich angenommen werden kann. Der Wert von α ergibt sich aus der Anzahl der faktoriellen Einzelversuche (n_F) und berechnet sich nach $\alpha = (n_F)^{(1/4)}$. Häufig sind nicht alle in das Modell aufgenommenen Faktoren signifikant. Aus diesem Grund wird oft eine Verfeinerung des Modells durchgeführt, indem nicht signifikante Faktoren entfernt werden.

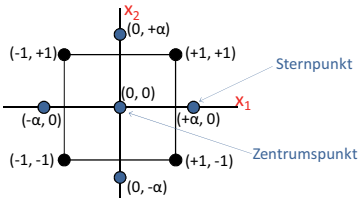


Abbildung 3-6: Graphische Darstellung eines Central Composite Versuchsplans mit zwei Faktoren x_1 und x_2;
Jeder Faktor wird für fünf verschiedene Niveaus untersucht (-α, -1, 0, 1, α), wobei unterschiedliche Kombinationen der beiden Faktoren vorliegen.

3.5.4 Prüfung der Angemessenheit des Modells

Wie oben beschrieben, wird mit Hilfe der Varianzanalyse statistisch überprüft, ob ein Modell (z. B. entsprechend den Gleichungen 3-3 oder 3-6) die Daten beschreiben kann. Voraussetzungen für die Varianzanalyse sind allerdings, dass die Fehler (Abweichung der Messwerte vom Modell) normal und unabhängig verteilt sind mit einem Mittelwert = 0 und konstanter Varianz. Eine Überprüfung dieser Voraussetzung erfolgt häufig in der Form von Diagrammen, wobei die Residuen über verschiedene Größen in Streudiagrammen aufgetragen werden. Grundsätzlich sollten die Residuen keine Muster aufweisen. Für den Fall, dass die Residuen jedoch erkennbare Strukturen aufweisen, wird häufig eine Transformation der Zielgröße durchgeführt, die die Varianzen stabilisieren soll. Daraufhin erfolgt eine Varianzanalyse mit den transformierten Werten. Verschiedenste Möglichkeiten der Transformation bestehen (z. B. Quadratwurzel, Logarithmus), wenn bereits Wissen zu der Verteilung der Beobachtungen vorhanden ist. Ohne Vorkenntnis wird häufig empirisch vorgegangen und eine Transformation gewählt, die eine Stabilisierung der Varianzen ermöglicht.

3.5.5 Optimierung anhand von *Desirability*-Funktionen

Für den Fall, dass ein Prozess anhand mehrerer Zielvariablen nicht nur charakterisiert, sondern auch optimiert werden soll, bietet sich ein objektives Verfahren basierend auf *Desirability*-Funktionen (Wünschbarkeitsfunktionen) an [247, 249, 251]. Hierbei wird für jede Zielgröße y_i eine individuelle *Desirability*-Funktion d_i definiert, die sich in einem Bereich $0 \le d_i \le 1$ bewegt. Der optimale Bereich für die Zielgröße y_i wird $d_i = 1$ zugeordnet und dem inakzeptablen Bereich $d_i = 0$. Für die Optimierung werden die einzelnen *Desirability*-Funktionen d_i über das geometrische Mittel kombiniert zu einer *Overall-Desirability* $D = (d_1 \times d_2 \times \ldots \times d_m)^{1/m}$, wobei m die Anzahl der Zielvariablen ist. Bei der Optimierung werden die Einflussgrößen so gewählt, dass die *Overall-Desirability* maximiert wird. Die einzelnen *Desirability*-Funktionen sind normalerweise kontinuierlich ansteigende oder abfallende Funktionen, je nachdem, ob die Zielgröße maximiert oder minimiert werden soll. Die Transformation von y zu d wird häufig bei zu maximierenden Zielgrößen wie in Gleichung 3-7 und bei zu minimierenden Zielgrößen wie in Gleichung 3-8 realisiert.

$$d = \begin{cases} 0 & für \quad y < N \\ \left(\frac{y-N}{Z-N}\right)^{\kappa} & für \quad N \le y \le Z \\ 1 & für \quad y = Z \end{cases} \qquad \textbf{3-7}$$

$$d = \begin{cases} 1 & für \quad y < Z \\ \left(\frac{H-y}{H-Z}\right)^{\kappa} & für \quad Z \le y \le H \\ 0 & für \quad y > H \end{cases} \qquad \textbf{3-8}$$

Desirability-Funktion:	d	Niedrigster Wert der Zielgröße:	N	Zielwert der Zielgröße:	Z
Zielgröße:	y	Höchster Wert der Zielgröße:	H	Exponent zur Gewichtung:	κ

Eine Gewichtung der verschiedenen Zielgrößen kann über den Exponenten κ erfolgen. Während Werte für $\kappa > 1$ ein größeres Gewicht verleihen, ist bei $0 < \kappa < 1$ die entsprechende Zielgröße weniger wichtig. Graphisch dargestellt sind die verschiedenen Möglichkeiten in Abbildung 3-7.

Über das geometrische Mittel werden somit die einzelnen Zielgrößen im Anschluss kombiniert und durch den Exponenten κ in den Gleichungen 3-7 und 3-8 kann jede Zielgröße individuell gewichtet werden. Somit bietet dieses Verfahren eine gute Möglichkeit zur simultanen Optimierung anhand mehrerer Zielgrößen.

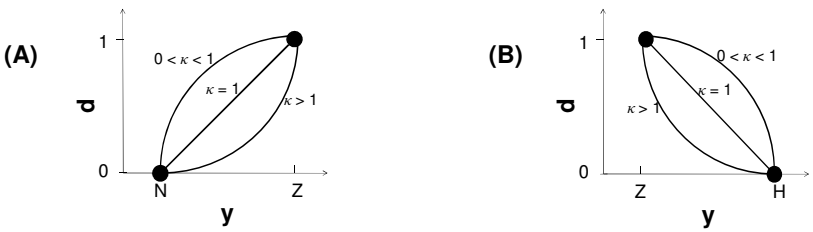


Abbildung 3-7: Graphische Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten der Gewichtung der Zielgrößen durch den Exponenten κ für zu maximierende (A) und zu minimierende (B) Zielgrößen.
y stellt die Zielgröße, d die Desirability dar; N ist der niedrigste Werte, Z der angestrebte Wert und H der höchste Wert.

3.6 Korrelationsanalyse von Daten intrazellulärer Metaboliten

Ein typisches Vorgehen bei der Auswertung von Messdaten ist die Darstellung der Messgröße über die Zeit, wodurch das zeitliche Verhalten der Messgröße dokumentiert werden kann. Neben der zeitlichen Abhängigkeit ist aber häufig auch die Abhängigkeit der Messgrößen voneinander von Interesse [245, 249, 252, 253]. Zur Überprüfung von Abhängigkeiten zweier Messgrößen bietet sich die Möglichkeit, Streudiagramme zu erzeugen, indem man je eine Variable auf *x*- und *y*-Achse aufträgt. Auf diese Weise können Korrelationen zwischen zwei Messgrößen direkt erkannt werden. Allerdings ist ab einer größeren Zahl von untersuchten Messgrößen eine genaue Begutachtung von Streudiagrammen mühevoll. Alternativ bietet sich eine Vereinfachung durch die Berechnung des Korrelationskoeffizienten *r* (3-9).

$$r_{xy} = \frac{\sum_i^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\left(\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2\right)\left(\sum_i^n (y_i - \bar{y})^2\right)}} \qquad \textbf{3-9}$$

Hierbei sind x_i bzw. y_i die einzelnen Werte und $\bar{x}$ bzw. $\bar{y}$ die Mittelwerte aus n Messungen der zu korrelierenden Variablen. Der Korrelationskoeffizient charakterisiert die Stärke des linearen Zusammenhangs zwischen den beiden Variablen x und y und kann Werte von -1 bis +1 annehmen. Für $r = 0$ besteht kein Zusammenhang zwischen den beiden Variablen. Für $r = 1$ besteht eine vollständige positive und für $r = -1$ eine vollständig negative Korrelation. Somit kann anhand des Korrelationskoeffizienten r eine Aussage über den Grad der Verhaltensähnlichkeit zweier Variablen getroffen werden. Als Einschränkung ist zu betonen, dass dieser Wert nur den linearen Zusammenhang widerspiegelt. Dies bedeutet, dass unter Umständen der wahre Zusammenhang zwischen den beiden Variablen durch eine andere Funktion deutlich besser zu beschreiben wäre. Auch können Korrelationskoeffizienten erheblich durch Ausreißer beeinflusst sein. Beide hier genannten Probleme können in Streudiagrammen erkannt werden. Wichtig zu erwähnen ist, dass der Korrelationskoeffizient keine Aussagen zu Ursache und Wirkung zulässt, da es sich bei einer hohen Korrelation z. B. auch um eine rein zufällige Koinzidenz handeln kann. Für mehr als zwei Variable bietet sich die Darstellung der Korrelationskoeffizienten in Form einer Korrelationsmatrix an, wobei sowohl auf der x- als auch y-Achse die Variablen aufgetragen sind. Die einzelnen Korrelationskoeffizienten für die verschiedenen Kombinationen der Metaboliten sind in den entsprechenden Feldern eingetragen. Ein Schema einer Korrelationsmatrix ist in Tabelle 3-2 gezeigt.

Tabelle 3-2: Schematischer Aufbau einer Korrelationsmatrix.

	$\mathbf{x_1}$	$\mathbf{x_2}$	$\mathbf{x_3}$	…	$\mathbf{x_n}$
$\mathbf{x_1}$	1	r_{12}	r_{13}	$r_{1...}$	r_{1n}
$\mathbf{x_2}$	r_{12}	1	r_{23}	$r_{2...}$	r_{2n}
$\mathbf{x_3}$	r_{13}	r_{23}	1	$r_{3...}$	r_{3n}
…	$r_{1...}$	$r_{2...}$	$r_{3...}$	1	$r_{...n}$
$\mathbf{x_n}$	r_{1n}	r_{2n}	r_{3n}	$r_{...n}$	1

x_1 bis x_n entsprechen den zu korrelierenden Variablen; in den Matrixfeldern zwischen den Variablen sind die verschiedenen Korrelationskoeffizienten eingetragen; in der Diagonalen von links oben nach rechts unten ist immer $r = 1$, da dieser Wert die perfekte positive Korrelation der jeweiligen Variablen mit sich selbst wiedergibt; diese Diagonale stellt auch die Spiegelachse dar, an welcher die beiden identischen Hälften der Korrelationsmatrix gespiegelt sind

Alternativ zu den Zahlenwerten in den einzelnen Feldern kann auch der Korrelationskoeffizient über eine Farbkodierung zur besseren Visualisierung angegeben werden. Durch diese Art der Auswertung kann ein schneller Überblick über mögliche Zusammenhänge zwischen Metaboliten erlangt werden. Gerade für den Fall von großen Datenmengen hat sich diese Methode der Visualisierung als hilfreich erwiesen. Insbesondere im Bereich der Metabolomanalyse für Pflanzen wurde die Korrelationsanalyse zur Auswertung in zahlreichen Arbeiten eingesetzt [127-131]. Aber auch für Hefen [139, 254] und *E. coli* [197] wurden Korrelationen zwischen Metaboliten zur Interpretation der Daten herangezogen. Der Ursprung von Korrelationen von Metaboliten wird in einigen Publikationen diskutiert [255-257]. Grundsätzliche Aussagen dieser Veröffentlichungen waren unter anderem, dass Metaboliten, die im chemischen Gleichgewicht stehen, einen sehr hohen Korrelationskoeffizienten haben. Weiterhin wurde festgestellt, dass für den Fall von Änderungen im

Korrelationsverhalten zwischen zwei Metaboliten unter unterschiedlichen Zuständen eine Änderung in der Regulation andeuten.

Im Falle der Analyse von Zeitreihen kommen oft zeitliche Verschiebungen zwischen zu korrelierenden Signalen vor. Aus diesem Grund wird für zeitabhängige Signale häufig eine Kreuzkorrelation verwendet, um Zusammenhänge aufzudecken [258, 259]. Eine Kreuzkorrelation bedeutet, dass eine zeitliche Verschiebung der Zeitreihen erlaubt wird, wodurch eine Deckungsgleichheit der Verläufe erreicht werden kann, was in einem höheren Korrelationskoeffizienten resultiert. Schematisch ist dies in Abbildung 3-7 dargestellt.

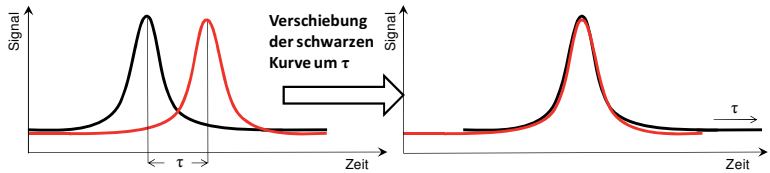


Abbildung 3-8: Schematische Darstellung der zeitlichen Verschiebung von Verlaufskurven für die Verwendung im Rahmen der Kreuzkorrelation.
Die Verläufe der beiden Kurven ähneln sich sehr, aber durch den Zeitversatz τ wären die beiden Verläufe nur minimal miteinander korreliert; durch Verschiebung der Kurven um τ wird eine annähernde Deckung erreicht, was in einer hohen positiven Korrelation resultiert.

Dieses Verfahren kam in der Vergangenheit unter anderem zum Einsatz, um Verläufe von Konzentrationsmessungen verschiedener Metaboliten miteinander zu korrelieren [260-262]. Basierend auf den Korrelationen wurden Rückschlüsse auf Stoffwechselnetzwerke und Regulation gezogen. Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten erfolgt gemäß

$$r_{ij}(\tau) = \frac{S_{ij}(\tau)}{\sqrt{S_{ii}(\tau)\, S_{jj}(\tau)}} \qquad \textbf{3-10}$$

$$\text{mit} \quad S_{ij}(\tau) = \left\langle \left(x_i(t) - \bar{x}_i\right)\left(x_j(t+\tau) - \bar{x}_j\right) \right\rangle \qquad \textbf{3-11}$$

wobei die spitzen Klammern den zeitlichen Durchschnitt repräsentieren. Für jede Zeitverschiebung τ wird somit ein Korrelationskoeffizient errechnet. Aus diesen Werten wird die maximale Korrelation bei entsprechendem τ ausgewählt. Auf diese Weise kann eine Korrelationsmatrix mit maximalen Korrelationskoeffizienten für jedes Paar von Signalen ermittelt werden. Zusätzlich kann eine Matrix mit den dazugehörenden Werten für die zeitliche Verschiebung erstellt werden. Der Kreuzkorrelationskoeffizient für den Spezialfall $\tau = 0$ zwischen zwei Variablen entspricht dem zuvor erwähnten Korrelationskoeffizienten bei einer Korrelationsanalyse. Zusätzlich kann eine Autokorrelation errechnet werden, wobei eine Variable mit sich selbst bei verschiedenen Werten für τ korreliert wird. Dies kann interessant sein, wenn ein periodisches Schwingungsverhalten der Variablen vorliegt. Für die hier vorliegende Arbeit ist die Autokorrelation allerdings nicht relevant, da kein periodisches Verhalten vorgefunden wurde oder die Zeitreihen zu kurz waren.

Als geeignetes Vorgehen bei der Auswertung einer großen Anzahl von z. B. Konzentrationsverläufen bietet sich an, zuerst entsprechend den Korrelationskoeffizienten einer Kreuzkorrelations-

matrix eine Gruppierung von Verläufen durchzuführen. Anschließend können dann repräsentative Verläufe aus den einzelnen Gruppen genauer begutachtet werden.

Von Arkin [260, 261] wurde auf Kreuzkorrelationen basierend eine sogenannte *Correlation Metric Construction* (CMC) durchgeführt. Dabei wurden die ermittelten Korrelationen in Distanzwerte transformiert, womit anschließend eine multidimensionale Skalierung und eine Clusteranalyse durchgeführt wurden. Auf diese Weise konnten basierend auf Konzentrationsmessungen Vorhersagen zu komplexen Reaktionsnetzwerken gemacht werden.

Grundsätzlich eignet sich somit sowohl eine konventionelle Korrelationsanalyse, als auch eine Kreuzkorrelationsanalyse zur Untersuchung multivariater Datensätze. Auf diese Weise können Zusammenhänge zwischen den einzelnen Variablen aufgeklärt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Eine Liste der in dieser Arbeit genutzten Geräte in im Anhang in Tabelle A 1 gegeben. Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind im Anhang in Tabelle A 2 angegeben. Eine Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien ist in der Tabelle A 3 im Anhang aufgeführt.

Für zahlreiche Arbeitsschritte wurde in dieser Arbeit eine Phosphat-gepufferte Salzlösung mit folgender Zusammensetzung eingesetzt: 8,0 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 0,20 g/L KH_2PO_4, 1,15 g/L Na_2HPO_4.

4.2 Zellkultur

Die Zellkultur wurde anhand der in der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik etablierten Arbeitsanweisungen durchgeführt. Das Auftauen der Zellen erfolgte gemäß der Arbeitsanweisung Nr. Z / 02 (s. Anhang). Passagiert wurden die Zellen entsprechend der Arbeitsanweisung Nr. Z / 04 (s. Anhang). Kurz zusammengefasst ist hier die Kultivierung beschrieben:

Vorkulturen aller Versuche von MDCK (ECACC Nr. 841211903) und Vero-Zellen (ECACC, Nr. 88020401) wurden bei 37 °C und 5% CO_2 in GMEM-Z (GMEM mit 10% FCS (fötales Kälberserum) und 2 g/L Pepton) und 4 g/L $NaHCO_3$ statisch (in T-Flaschen) oder dynamisch (in Rollerflaschen) kultiviert. Für alle in Kapitel 5.2 im Detail beschriebenen Versuche zur Extraktion wie auch sämtliche statische Kultivierungen in Abschnitt 5.3, die genauer charakterisiert wurden, wurden die Zellen in Sechs-Well Platten kultiviert. Für diese Versuche wurde eine maximale Passagenzahl von 20 nach dem Auftauen der Arbeitszellbank verwendet.

4.3 Analytik

4.3.1 Lumineszenzmessung von ATP

Zur Bestimmung des ATP Gehalts von Zellen wurde alternativ zur Chromatographie ein Lumineszenz-Test (ATPlite Luminescence ATP Detection Assay System; Perkin-Elmer) verwendet. Zur Kalibrierung wurden sieben äquidistante Verdünnungen von in Milli-Q Wasser gelöstem ATP im Bereich von 1 bis 100 µM erstellt. Für Standards und Proben wurden 90 µL PBS in 96-Well-Platten (Greiner) pipettiert. Ein Volumen von 10 µL der Probe oder des Standards wurden hinzugefügt. Die Platte wurde für 1 min bei 750 rpm geschüttelt und anschließend wurden 50 µL der Enzymlösung zugegeben und wiederum für 1 min geschüttelt. Abschließend wurde jedes Well für 1 s mit dem Luminometer (Mithras L 940, Berthold) gemessen. Für Proben, die Perchlorsäure (PCS) enthielten, wurde eine getrennte Kalibrierung aufgenommen, wobei 10 µL von neutralisierter PCS zu 80 µL PBS hinzugegeben wurden, um den Einfluss der Salzlösung zu kompensieren. Basierend auf den mehrfach bestimmten Proben aus Abschnitt 5.2.7.1 wurde eine mittlere relative Standardabweichung von 6,2% ermittelt.

4.3.2 Zellzählung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit dem Gerät ViCell XR (Beckman Coulter) gemäß der Kurzanleitung Zellzählgerät ViCell XR (s. Anhang). Hierzu wurde das Medium der adhärenten Zellen abgenommen, 3× mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1× konzentriertem Trypsin für ca. 30 min behandelt. Für Sechs-Well-Platten betrug das Trypsinvolumen 1 mL pro Well. Das Abstoppen der Trypsinaktivität wurde mit dem gleichen Volumen Zellkulturmedium durchgeführt. Bei Kulturen älter als sechs Tage wurde die Zellsuspension mehrmals auf- und abpipettiert, um ein komplettes Ablösen der Zellen zu gewährleisten. MDCK-Zellen wurden mit den Zelltypen *MDCK_100* (Abschnitt 5.2) bzw. *MDCK_big* (Abschnitt 5.3) und Vero-Zellen mit dem Zelltyp *Vero_100* gezählt (s. Anhang Tabelle A 4). Grundsätzlich wurden bei Versuchsreihen in Sechs-Well-Platten mindestens drei Wells für einen Probenahmezeitpunkt zur Zellzahlbestimmung genutzt. Details zu jedem Experiment sind den entsprechenden Abschnitten zu entnehmen. Basierend auf den mehrfach bestimmten Zellzählungen der Kultivierungsexperimente wurde eine durchschnittliche relative Standardabweichung bei der Zellzählung von MDCK-Zellen von 5,6% ermittelt. Dies bezieht sich auf die Kultivierung von MDCK-Zellen in Sechs-Well Platten und einer Zellzählung nach dem beschriebenen Verfahren. Für Vero-Zellen wurde dementsprechend eine durchschnittliche relative Standardabweichung von 6,5% ermittelt.

4.3.3 Mikroskopie zur Bestimmung des Zellvolumens

Zur Bestimmung des zellulären Volumens im adhärenten Zustand wurden die Zellen wie oben beschrieben in Sechs-Well Platten kultiviert. Für jeden Probenzeitpunkt wurden drei Wells als Vergleichsmessung mit dem Gerät ViCell XR gezählt. Zum gleichen Zeitpunkt wurden die Zellen wie folgt gefärbt. Nach dem Abgießen des Mediums wurden die Zellen dreimal gewaschen. Daraufhin wurde ein Volumen von 100 µL des Farbstoffes 5-Hexadecanoylaminofluorescein (Molecular Probes; gelöst in Ethanol (EtOH); 5 g/L) mit einer Konzentration von 25 mg/L (in Milli-Q Wasser) zu den Zellen gegeben und für einen Zeitraum von 5-20 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und ein ebenes Stück des Bodens der Sechs-Well-Platte wurde mechanisch herausgebrochen. Dieses Stück wurde auf ein Mikroskopiedeckgläschen gelegt und mit dem Laserscanningmikroskop (LSM 510, Zeiss) mit 400-facher Vergrößerung (Ölimersion) mikroskopiert. Hierzu wurde mit einer Laserwellenlänge von 488 nm angeregt und bei 520 – 530 nm detektiert. Es wurde eine horizontale Schichtdicke von 0,5 µm eingestellt und je nach Grad der Färbung der Zellen unterschiedliche Beleuchtungszeiträume und Detektorverstärkungen gewählt. Die Auswertung erfolgte mit der Software LSM-Image Browser (Version 4.2.0.121; Zeiss) per manueller Eingrenzung der Zellflächen in jeder Ebene und anschließender Aufsummierung der einzelnen Volumina jeder Ebene (Schichtdicke 0,5 µm × Fläche der Ebene) zum Gesamtvolumen der Zelle. Für die drei unter 5.2.6 beschriebenen Zeitpunkte wurden je 50 Zellen ausgewertet.

4.3.4 Bestimmung von Glucose, Lactat, Glutamin, Glutamat und Ammonium

Die Bestimmung der extrazellulären Metaboliten Glucose, Lactat, Glutamin, Glutamat und Ammonium erfolgte mit dem Gerät Bioprofile entsprechend der Arbeitsanweisung „G_22_Bedienungsanweisung_Bioprofile.doc“ mit folgenden Modifikationen. Jede Konzentration des Standards wurde in einer Messsequenz mindestens dreifach bestimmt, wobei je eine Messung zu Beginn und am Ende der Messsequenz durchgeführt wurde. Bei Kultivierungsverläufen in Sechs-Well-Platten wurden für jeden Zeitpunkt Proben aus mindestens drei Wells entnommen. Die Proben wurden in randomisierter Reihenfolge gemessen. Die Arbeitsbereiche für die verschiedenen Metaboliten sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 4-1: Validierte Messbereiche und relative Verfahrensstandardabweichung für das Gerät Bioprofile für die mit diesem Geräte quantifizierten extrazellulären Metaboliten (Validierungsmessungen vom 13.06.2006).

	Konzentration [mM]	**± rel. Verfahrensstandardabweichung [%]**
Glucose	3,9 – 41,0	± 1,9
Lactat	8,4 – 33,3	± 6,4
Glutamin	0,25 – 2,60	± 3,9
Glutamat	0,29 – 2.60	± 2,1
Ammonium	0,15 – 5,20	± 4,5

4.3.5 UV-Messung zur Bestimmung von makromolekularen Verunreinigungen

Zur Bestimmung des Absorptionswertes der Extraktionsproben bei 280 nm wurde wie folgt vorgegangen. Die nach der Probenvorbereitung getrockneten Proben wurden in Milli-Q Wasser gelöst und entweder unverdünnt oder verdünnt mit Milli-Q Wasser (je nach erwartetem Absorptionswert) in 1,5 mL Küvetten bei 280 nm gemessen. Zum Nullwertabgleich wurde entweder mit Wasser, verdünnter PCS (angepasst an die Proben) oder Zelllysereagenz (des Lumineszenztests, ebenfalls angepasst an die Proben) gemessen. Proben der Versuche in Kapitel 5.2.2 wurden vor den Messungen 1:4 verdünnt.

4.3.6 Anionen-Austausch Chromatographie zur Bestimmung intrazellulärer Metaboliten

Alle chromatographischen Messungen wurden mit einer Anlage des Typs DX320 (Dionex) gemäß der gruppeninternen Arbeitsanweisung BioLC Anlage DX320 (s. Anhang) durchgeführt. Kurz beschrieben wurde wie folgt gemessen. Grundsätzlich wurde in zwei verschiedenen Konfigurationen der Chromatographieanlage gemessen, d. h. entweder mit oder ohne MS-Detektor (MSQ Plus Mass Detector, Thermo Scientific). Für beide Aufbauten war der Gebrauch der Säulen identisch. Dabei fand die chromatographische Trennung auf einer Vorsäule (AG11) und zwei analytischen Säulen (in Serie, AS11) statt. Die Pumpe wurde mit einem Fluss von 0,35 mL/min und der Suppressor bei einem Strom von 60 – 70 mA betrieben. Die Temperatur des Säulenofens war 25 °C, die des Autosamplers 4 °C. Das Injektionsvolumen betrug 20 µL. Die Wellenlänge des UV-Detektors wurde, wie weiter unten im Detail beschrieben, zwischen 220 nm und 260 nm variiert. Bei Betrieb des MS-Detektors wurde der Regenerationsstrom durch eine externe AXP-Pumpe oder

mittels Kopfdruck auf der Reservoirflasche realisiert, so dass ein minimaler Fluss von etwa 0,2 mL/min nicht unterschritten wurde. Für die *Cone-Wash*-Funktion des MS-Detektors wurde ein 50:50 Gemisch MeOH/Milli-Q-Wasser mit einer weiteren AXP-Pumpe bei einem Fluss von 0,15 mL/min gefördert. Die Entwicklung des Gradientenprofils und die Zusammensetzung des Standards sind in Abschnitt 5.1.1 beschrieben.

Für die chromatographischen Messungen im weiteren Verlauf der Arbeit, wurde zur Kalibrierung eine Verdünnungsreihe der Standardlösungsmischung aus sieben äquidistanten Verdünnungen (5 – 155 µL auf 1000 µL; Konzentration der Standardlösungsmischung s. Tabelle 5-4, erste Spalte, Zahlen in Klammern) pipettiert und als externer Standard in randomisierter Reihenfolge zwischen den Proben gemessen. In der Summe einer Sequenz wurde dabei ein Verhältnis von Standard/Probe von 1:4 nicht unterschritten, was bedeutet, dass mindestens ein Standard pro vier Proben gemessen wurde. Des Weiteren wurde die Peakfläche für die Kalibrierung verwendet und zur Regression entweder ein Polynom 1. oder 2. Ordnung verwendet. Nach Installation des MS-Detektors (Abschnitt 0) wurde die Kalibrierungsstrategie im Lauf der Arbeit modifiziert, um den Bedingungen der MS-Detektion gerecht zu werden. So wurde für die meisten Metaboliten, welche mit dem MS-Detektor quantifiziert werden sollten, eine gewichtete Regression der Form *(1/Konzentration)* zur Kalibrierung verwendet [195, 250]. Eine Beschreibung der Vorgehensweise ist in Abschnitt 0 gegeben.

Die chromatographischen Messungen mit der Chromatographieanlage DX600 wurden durchgeführt wie hier kurz beschrieben. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer Vorsäule (CarboPac PA-100G, 2 × 50 mm) und einer analytischen Säule CarboPac PA-100 (2 × 250 mm) bei 30 °C. Die Gradientenpumpe (DX-GS50) wurde mit einem Fluss von 0,25 mL/min betrieben. Das Injektionsvolumen betrug 20 µL und die Proben wurden mit einem Autosampler des Typs DX-AS50 (bei 4 °C) injiziert. Sämtliche Eluenten wurden mit Milli-Q Wasser angesetzt, Vakuum filtriert und anschließend weitere 5 min entgast. Detektiert wurde nach dem Prinzip der gepulsten-amperometrischen Detektion mit einem Gerät des Typs (DX-ED50) mit einer Gold-Arbeitselektrode und einer Ag/AgCl-Referenz-Elektrode.

4.4 Probenvorbereitung zur Bestimmung intrazellulärer Metaboliten

Wie bereits oben beschrieben, wurde die Probenvorbereitung für die Messung von intrazellulären Stoffwechselprodukten in dieser Arbeit genauer untersucht und optimiert. Verschiedenste Methoden kamen im Laufe von Vorversuchen zum Einsatz, die hier aber nicht beschrieben werden. Basierend auf den Erfahrungen dieser Vorversuche, wurde ein systematischer, vierstufiger Auswahl- und Optimierungsprozess für eine geeignete Extraktionsmethode durchgeführt (Abschnitt 5.2). Grundsätzlich wurde bei den in Abschnitt 5.2 beschriebenen Experimenten wie folgt vorgegangen: MDCK-Zellen (2,5-4,5 × 10^6 Zellen/Well) bzw. Vero-Zellen (3,5-6,5 × 10^6 Zellen/Well) wurden direkt in den Wells der Sechs-Well-Platten extrahiert, wobei eine Extraktionsmethode bei allen Wells einer Platte angewendet wurde. Für den Fall eines Waschschrittes wurde der Zellkulturüberstand schnellst möglich abgegossen und jedes Well mit 1 mL PBS (4 °C) gewaschen.

Direkt nach dem Abgießen der Waschflüssigkeit wurden die Wells extrahiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 16000 g, 0 °C für 10 min durchgeführt. Zentrifugationsschritte, der Trockenvorgang und die Aufbewahrung der Proben erfolgten immer in 2,2 mL-Probenröhrchen (Greiner Bio-One). Falls nicht explizit erwähnt, wurden die getrockneten Proben vor dem Messen in 600 µL Milli-Q Wasser gelöst.

Im Zusammenhang mit verschiedenen Experimenten werden im Verlauf der hier vorliegenden Arbeit verschiedene Konzentrations- bzw. Mengenangaben gemacht. Tabelle 4-2 soll dies erläutern. Je nach Experiment erschien die eine oder andere Angabe der Metabolitmenge oder –konzentration sinnvoller bzw. hilfreicher. Zur Bestimmung des Gesamtzellvolumens sei auf Kapitel 5.2.6 verwiesen.

Tabelle 4-2: Erläuterung der verschiedenen Angaben zu Metabolitmengen und -konzentrationen

Metabolitkonzentration pro Well	Gemessene Konzentration der Probe in dem Volumen, in dem gelöst wurde
Zellspezifische Metabolitmenge	*Metabolitkonzentration pro Well* multipliziert mit dem Volumen, in dem gelöst wurde; geteilt durch die Zellzahl pro Well
Intrazelluläre Metabolitkonzentration	*Metabolitkonzentration pro Well* multipliziert mit dem Volumen, in dem gelöst wurde, geteilt durch das Gesamtzellvolumen eines Wells

4.4.1 Untersuchung gängiger Extraktionsmethoden

Der erste Schritt des Optimierungsprozesses war der Vergleich von Methoden, die in der Literatur häufiger erwähnt sind. Die einzelnen Methoden zur Extraktion von intrazellulären Metaboliten sind hier näher beschrieben. Da die verschiedenen Methoden zu Ende der Probenvorbereitung in stark unterschiedlichen Probenmatrizes resultieren, war eine chromatographische Bestimmung der Metaboliten nicht für alle Methoden möglich. Aus diesem Grund wurden als Messgrößen für die Auswahl eines geeigneten Verfahrens die ATP-Konzentration (bestimmt durch Lumineszenzmessung) und der Absorptionswert der Probe bei einer Wellenlänge von 280 nm verwendet (*Absorption 280 nm*). Dieser Absorptionswert wurde als Richtwert für eine Abreicherung von makromolekularen Verunreinigungen genutzt. Eine gute Methode war charakterisiert durch einen hohen ATP-Wert und einen niedrigen Absorptionswert. Die hier erwähnten Experimente erfolgten ausschließlich mit MDCK-Zellen. Die in den nächsten Unterpunkten beschriebene Ultraschallbehandlung erfolgte auf Eiswasser und dauerte 5 min.

Perchlorsäure Extraktion („PCS“, Methode A)

Diese Methode orientierte sich an dem von Ryll und Wagner [178] beschriebenen Verfahren. Es wurden 1000 µL einer 0,5 M PCS (4 °C) auf den Zellrasen pipettiert. Daraufhin wurden die Sechs-Well-Platten mit Ultraschall behandelt. Der Überstand wurde in ein Probengefäß transferiert und danach zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet erneut mit 0,5 M PCS extrahiert, danach zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände vereinigt und mit 600 µL

2,5 M KOH in 1,5 M K_2HPO_4 neutralisiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation. Der Überstand wurde bei -70 °C bis zur Messung aufbewahrt.

Extraktion mit kochendem MeOH („Kochendes MeOH", Methode B), kochendem EtOH („Kochendes EtOH", Methode C) und kochendem Wasser („Kochendes H_2O"; Methode D)

Diese Methoden wurden übernommen von Shryock et al. ([226]; „Kochendes MeOH"), Gonzalez et al. ([211]; „Kochendes EtOH") bzw. Bhattacharya et al. ([31]; „Kochendes H_2O"). Nach dem Abgießen des Überstandes wurde für Methode B MeOH in H_2O (80%, 2 mL, 70 °C), für Methode C EtOH in H_2O (75%, 2 mL, 80 °C) und für Methode D H_2O (2 mL, 95 °C) auf den Zellrasen pipettiert. Anschließend wurden die Platten für 2 min in einem 70 °C („Kochendes MeOH"), 80 °C („Kochendes EtOH") bzw. 95 °C („Kochendes H_2O") warmen Wasserbad inkubiert. Danach erfolgte die Ultraschallbehandlung, die Überstände wurden in Probengefäße transferiert, zentrifugiert und abschließend getrocknet.

Ameisensäure Extraktion („Ameisensäure", Methode E)

Ameisensäure (1 M, 2 mL) wurde auf den Zellrasen pipettiert. Nach der Ultraschallbehandlung wurden die Überstände in Probengefäße transferiert, zentrifugiert und getrocknet. Diese Methode orientierte sich an der von Goulard et al. [176] beschriebenen.

Extraktion mit kaltem Acetonitril („Kaltes ACN", Methode F), kaltem EtOH („Kaltes EtOH", Methode G) und kaltem MeOH („Kaltes MeOH"; Methode H)

Diese Extraktionen erfolgten in Anlehnung an die von Grob et al. [236] bzw. Vogt et al. [32] beschriebenen Verfahren. Ein Volumen von 2 mL 4 °C kaltes ACN, EtOH oder MeOH (jeweils 60% in H_2O) wurde auf den Zellrasen pipettiert. Danach folgte die Ultraschallbehandlung. Die Überstände wurden in Probengefäße transferiert, zentrifugiert und getrocknet

MeOH/$CHCl_3$ Extraktion („MeOH/$CHCl_3$", Methode I)

Diese Methode wurde übernommen von Le Belle et al. [263]. Dazu wurde ein Volumen von 600 µL MeOH (100%, 4 °C) auf den Zellrasen pipettiert und die Platten mit Ultraschall behandelt. Daraufhin wurden 600 µL eines 25 mM Tricine Puffers zugegeben und die Platten erneut mit Ultraschall behandelt. Der Überstand wurde in Probenröhrchen überführt und 600 µL $CHCl_3$ (100%) wurden zugegeben. Anschließend wurden die Proben für 30-60 s gevortext und danach zentrifugiert. Ein Volumen von 1000 µL wurde von der wässrigen Phase entnommen und eine zweite Extraktion wurde mit der verbleibenden organischen Phase durchgeführt. Dazu wurden 500 µL Methanol zur $CHCl_3$-Phase gegeben, danach wurde gevortext und daraufhin wurden 500 µL des Tricine Puffers zugegeben. Wieder wurde gevortext, danach zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit der wässrigen Phase der ersten Extraktion vereint und anschließend getrocknet.

MeOH-Kochen Extraktion („MeOH/Kochen", Methode J)

Diese Methode wurde in vorangegangenen Experimenten (nicht gezeigt) entwickelt und lieferte grundsätzlich gute Ergebnisse. Hierfür wurden 1200 µL MeOH (100 %, 4 °C) auf den Zellrasen pipettiert. Daran schloss sich die Ultraschallbehandlung an. Anschließend wurden 800 µL Tricine

Puffer (25 mM, 4 °C) zugegeben, eine weitere Ultraschallbehandlung folgte. Der Überstand wurde danach in Probengefäße überführt und für 2 min bei 100 °C gekocht. Hierauf wurden die Proben auf Eis gekühlt, zentrifugiert und getrocknet.

Zelllyse (Methode K)

Diese Methode ist das für den Lumineszenz Test (Perkin Elmer) empfohlene Verfahren. Ein Volumen von 1000 µL des Zelllysereagenz (mit dem Lumineszenz Test geliefert) wurde auf den Zellrasen pipettiert, die Platten wurden kurz geschüttelt und anschließend wurde die Flüssigkeit in Probengefäße überführt.

4.4.2 Optimierung entsprechend eines fraktionellen faktoriellen Versuchsplans

Dieser Versuchsplan wurde gewählt, da sich ein fraktionelles faktorielles Versuchsdesign besonders gut eignet, eine große Anzahl an möglichen Einflussgrößen bei überschaubarem Aufwand zu untersuchen. Es wurde für die beiden Methoden „MeOH/Kochen“ und „MeOH/$CHCl_3$“ je eine unabhängige Optimierung durchgeführt. Grundlagen für die Auswahl dieser beiden Methoden waren einerseits die Ergebnisse der Untersuchung gängiger Extraktionsmethoden (s. 5.2.1), andererseits wurden die analytischen Grundvoraussetzungen (z. B. Anwendbarkeit in Kombination mit der AAC) wie auch Erkenntnisse aus weiteren, nicht gezeigten Vorversuchen berücksichtigt. Das experimentelle Design und die Auswertung dieser Experimente wurde mit dem Programm JMPin (Version 4.0.3, SAS Institut) durchgeführt. Es wurden 2-Level fraktionelle faktorielle Versuchspläne gewählt. Die Auswahl der Niveaus wurde in dieser Arbeit anhand vorangegangener Experimente getroffen. Für diese Experimente wurden vier verschiedene Zielgrößen untersucht: der *Nukleotidgehalt*, die *Energy Charge*, der *Fructose-1,6-Bisphopshat-Gehalt* und die *Absorption bei 280 nm*. Eine detaillierte Erklärung ist in Abschnitt 5.2.2.1 gegeben. Eine Optimierung wurde mit *Desirability*-Funktionen, wie in Abschnitt 3.5.5 beschrieben, durchgeführt.

MeOH/Kochen Extraktion: Fraktionelles faktorielles Design

Abbildung 5-7 (s. S. 72) zeigt die sechs Einflussgrößen (*Waschen, Temperatur MeOH, Volumen MeOH, Ultraschallbehandlung, Puffer* und *Kochen*), deren Effekt auf die Zielgrößen in diesem Experiment geklärt werden sollte. Eine Zusammenfassung der Niveaus der verschiedenen Faktoren ist in Tabelle 4-3 (A) gegeben. Für dieses Experiment wurde ein 2^{6-2} Versuchsplan mit der Auflösung IV ausgewählt. Zur Reduktion des Designs wurden folgende Generatoren gewählt:

$I = (Temperatur\ MeOH) \times (Kochen) \times (Ultraschall\ Behandlung) \times (Puffer)$

$I = (Volumen\ MeOH) \times (Waschen) \times (Ultraschall\ Behandlung) \times (Puffer)$

Somit waren 16 Sechs-Well-Platten unter unterschiedlichen Bedingungen zu extrahieren.

MeOH/$CHCl_3$ Extraktion: Fraktionelles faktorielles Design

Ein Überblick über die zu testenden Einflussgrößen dieser Methode (*Volumen $CHCl_3$, Verhältnis MeOH/Puffer, Ultraschallbehandlung, Puffer* und *Anzahl der Extraktionen*) ist in Abbildung 5-7 (B) (s. S. 72) gegeben. Die Niveaus der Faktoren sind in Tabelle 4-3 (B) zusammengefasst.

Tabelle 4-3: Zusammenfassung der Faktoren und Niveaus (Level) für die fraktionellen faktoriellen Versuchspläne zur Optimierung der Methoden MeOH/Kochen (A) und MeOH/$CHCl_3$ (B)

(A) MeOH/Kochen

Level	*Waschen*	*Kochen*	*Ultraschallbehandlung*	*Puffer*	*Temperatur MeOH*	*Volumen MeOH*
L1 / -1	1x Waschen mit PBS	2 min Kochen bei 100 °C	5 min vor und nach der Zugabe des Puffers	H_2O	-70 °C	1000 µL
L2 / 1	kein Waschen	kein Kochen	keine Behandlung	25 mM Tricine Puffer	0 °C	1600 µL

(B) MeOH/$CHCl_3$

Level	*Volumen $CHCl_3$*	*Verhältnis MeOH / Puffer*	*Ultraschallbehandlung*	*Puffer*	*Anzahl der Extraktionen*
L1 / -1	600 µL	1 : 1	5 min vor und nach der Zugabe des Puffers	H_2O	1
L2 / 1	1000 µL	3 : 1	keine Behandlung	25 mM Tricine Puffer	2

Zum Screening der Faktoren wurde ein 2^{5-2} Versuchsplan ausgewählt (Auflösung III). Die Reduktion der Anzahl der Einzelexperimente wurde anhand folgender Generatoren vorgenommen:

$I = (Puffer) \times (Volumen\ CHCl_3) \times (Verhältnis\ MeOH/Puffer) \times (Ultraschallbehandlung)$

$I = (Anzahl\ der\ Extraktionen) \times (Verhältnis\ MeOH/Puffer) \times (Ultraschallbehandlung)$

Der Versuchsplan erforderte acht Einzelexperimente.

4.4.3 Optimierung entsprechend eines *Central Composite* Versuchsplans

Nachdem einige Faktoren durch die Screening Experimente festgelegt werden konnten, waren für beide Methoden („MeOH/Kochen“ und „MeOH/$CHCl_3$“) je drei kontinuierliche Einflussgrößen genauer zu charakterisieren, da sie ein Optimumverhalten vermuten ließen. Dazu wurde ein *Central Composite* Versuchsplan gewählt.

MeOH/Kochen Extraktion: *Central Composite* Versuchsplan

Die drei Einflussgrößen *Volumen MeOH*, *Tricine Konzentration* und *Kochdauer* wurden in diesem Experiment untersucht. Tabelle 4-4 (A) zeigt für das erste Experiment die skalierten Niveaus -1 und 1 die entsprechenden realen Niveaus. Die weiteren in einem *Central Composite* enthaltenen Niveaus der Sternpunkte und des Zentrumspunktes bei den skalierten Werten von -1,68, 0 und 1,68 sind daraus zu errechnen (nicht gezeigt). Der Kochvorgang wurde für dieses Experiment bei 90 °C durchgeführt, um einem Überkochen vorzubeugen. Da in Folge dieses Experiments keine eindeutigen Schlüsse gezogen werden konnten, wurde ein zweites Experiment entsprechend eines *Central Composite* Versuchsplans durchgeführt, dessen Faktorniveaus leicht verändert wurden (Tabelle 4-4 B). Für beide Experimente wurden die Zellen nach dem Entfernen des Zellkulturüberstandes einmal mit 4 °C PBS gewaschen, das MeOH für die Extraktion hatte eine Temperatur von -70 °C und es wurde keine Ultraschall Behandlung angewendet. Erklärungen hierfür werden in Kapitel 5.2.2.1 gegeben.

MeOH/$CHCl_3$ Extraktion: *Central Composite* Versuchsplan

Für dieses Experiment wurden die Einflussgrößen Volumen MeOH, Tricine Konzentration und Volumen $CHCl_3$ genauer untersucht. Die realen Niveaus entsprechend den skalierten Niveaus -1 und 1 sind in Tabelle 4-4 (C) gegeben.

Tabelle 4-4: Zusammenfassung der Faktoren und Niveaus (Level) +1 und -1 für den Central Composite Versuchsplan zur Optimierung der Methoden MeOH/Kochen (1. Experiment: (A); 2. Experiment: (B)) und MeOH/$CHCl_3$ (C).

(A) MeOH/Kochen 1. Experiment			
Level	***MeOH Vol. [µL]***	***Tricine Konz. [mM]***	***Kochen [min]***
-1	1000	6	2
1	1600	16	6
(B) MeOH/Kochen 2. Experiment			
Level	***MeOH Vol. [µL]***	***Tricine Konz. [mM]***	***Kochen [min]***
-1	800	6	1,5
1	1600	20	5,5
(C) MeOH/$CHCl_3$			
Level	***MeOH Vol. [µL]***	***Tricine Konz. [mM]***	***Kochen [min]***
-1	250	8	500
1	550	20	1100

Die verbleibenden Niveaus der Sternpunkte und des Zentrumspunktes (-1,68; 0; 1,68) wurden berechnet wie in Abschnitt 3.5.3 erklärt.

4.4.4 Bestimmung der Wiederfindung

Für die Ermittlung der Wiederfindung wurden entweder Sechs-Well-Platten ohne Zellbewuchs oder mit Zellen verwendet. Erstgenannter Versuchsaufbau sollte zur Bestimmung der reinen chemisch-physikalischen Verluste dienen. Die Wiederfindungsbestimmung mit Zellen sollte die Frage klären, ob sämtliche enzymatische Aktivität während und nach der Extraktion inhibiert ist. Bei einigen Experimenten wurden zwei verschiedene Volumina der Standardlösung eingesetzt, um zu überprüfen, ob eine Konzentrationsabhängigkeit der Wiederfindung besteht. Für die Versuche ohne Zellen wurde der Standard direkt in die leeren Wells der Sechs-Well-Platten pipettiert. Daran schloss sich die vollständige Probenvorbereitung an. Für die Versuche mit Zellen wurde der Standard nach dem Waschschritt zu den Wells zugegeben und direkt mit der Extraktionsprozedur begonnen.

4.5 Korrelationsanalyse

In dieser Arbeit wurde das Korrelationsverhalten von verschiedenen Variablen untersucht. Dies fand zum Teil in Form von Streudiagrammen statt, aber der Großteil dieser Auswertung wurde auf die Berechnung des Korrelationskoeffizienten beschränkt. Diese Berechnungen werden im weiteren Verlauf als Korrelationsanalyse bezeichnet.

Zwei verschiedene Arten von Korrelationsanalysen wurden durchgeführt. Als Korrelationsanalyse wird in den folgenden Abschnitten die Berechnung des Korrelationskoeffizienten entsprechend Gleichung 3-9 bezeichnet. Im Falle einer Kreuzkorrelationsanalyse handelt es sich hier um eine

Berechnung entsprechend Gleichungen 3-10 und 3-11. Grundsätzlich entspricht die sogenannte Korrelationsanalyse der Kreuzkorrelationsanalyse für den Spezialfall von $\tau = 0$.

Zur Auswertung der Experimente in den Kapiteln 5.3.1 und 5.3.4.3 wurde eine Korrelationsanalyse verwendet. Die Korrelationskoeffizienten und *p*-Werte wurden mithilfe der Matlab-Funktion *corrcoef* ermittelt.

Für die Kreuzkorrelationsanalysen in Kapitel 5.3 wurde wie folgt verfahren. Für die Berechnung der Kreuzkorrelationskoeffizienten wäre ein Minimum von äquidistanten Messpunkten erforderlich ($n > 50$; [258]). Da dieses Kriterium mit den Messdaten in dieser Arbeit nicht erfüllt werden konnte, wurde auf eine Interpolation durch Splines zurückgegriffen [264] oder durch eine sigmoide Funktion. Bezüglich der Splines wurde im Detail verfahren wie von Wahl 2007 [265] beschrieben. Zur Berechnung wurde die Funktion e02bec aus der NAG-C Library (Numerical Algorithms Group LTd. Oxford, UK) verwendet. Für eine detaillierte Beschreibung sei auf die erwähnte Literatur verwiesen. Grundsätzlich ist bei diesem Verfahren ein Glättungsfaktor *S* zu wählen. Für einen Glättungsfaktor *S* mit großem Wert, wird eine große Abweichung zwischen den gemessenen und den geglätteten Werte zugelassen, was einer starken Glättung der Daten entspricht. Wählt man einen kleinen Wert für *S,* wird entsprechend weniger geglättet und die Splines werden durch die Messwerte „gezwungen". Auf diesen Berechnungen basierend wurden Splines an die Daten der verschiedenen Messungen angepasst. Dazu wurde die von Wahl (2007) programmierte Benutzeroberfläche verwendet [265]. Die Auswahl von *S* erfolgte durch optische Überprüfung der Anpassung und wurde für jeden Metaboliten und jedes Experiment separat durchgeführt. Für einige Variablen wurden keine Splines zur Interpolation verwendet, sondern es wurden mit der Software Origin 8 (SR1, Origin Lab Corporation) sigmoide Boltzmann Funktionen entsprechend der Gleichung 4-1 an die Daten angepasst.

$$y = \left(\frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x - x_0)/dx}} \right) + A_2 \qquad \textbf{4-1}$$

Hierbei ist A_1 der Anfangswert, A_2 der Endwert, x_0 ist der Zentrumswert und dx ist eine Zeitkonstante. Diese Näherung wurde grundsätzlich für die Interpolation der Zellzahl und des Zellvolumens verwendet. In einigen Fällen wurden auch die Verläufe von extrazellulären Metaboliten durch ein Boltzmann Sigmoid interpoliert. Ein Minimum von 100 äquidistanten Konzentrationswerten wurde auf den Splines bzw. der Funktion des Boltzmann Sigmoides basierend generiert. Diese dienten als Grundlage für die Kreuzkorrelationsanalyse. Eine Tabelle mit der Angabe zur Art der Interpolation (Spline oder Boltzmann Sigmoid) und den Werten für die Glättungsfaktoren *S* für die gezeigten Versuche ist im Anhang gegeben (Tabelle A 5). Weitere Details hierzu werden bei den einzelnen Experimenten im Abschnitt 5.3 gegeben. Die erzeugten Konzentrationsverläufe für die unterschiedlichen Metaboliten wurden anschließend kreuzkorreliert (s. Abschnitt 3.6). Es wurde somit für jede Zeitverschiebung τ eine Korrelationskoeffizientenmatrix berechnet. Aus diesem Satz von Matrizen wurde anschließend für jede Kombination der Metaboliten der Korrelationskoeffizient mit dem höchsten Betrag gesucht. Diese Werte und die

dazugehörenden Zeitverschiebungen τ wurden für die Kreuzkorrelationsmatrizen in Abschnitt 5.3 verwendet. Für die Zeitverschiebung τ wurde ein maximaler Wert von 10% der Gesamtdauer des Versuchs erlaubt. Die Verschiebung der Verläufe erfolgte in diskreten Schritten. Z. B. war für die Kultivierungsversuche eine maximale Zeitverschiebung von 10 h erlaubt und ein Verschiebungsschritt betrug 1 h.

4.6 Pulsexperimente

Die Kurzzeitexperimente wurden mit MDCK-Zellen in Sechs-Well Platten durchgeführt. Die Einsaatzelldichte betrug ca. 2×10^5 Zellen/Well. Die Zellen wurden anschließend bis in die späte exponentielle Wachstumsphase in dem Medium GMEM-Z kultiviert.

Das eigentliche Experiment wurde nicht unter sterilen Bedingungen durchgeführt, was bedeutet, dass außerhalb der Sterilwerkbank gearbeitet wurde. Zellkulturüberstände wurden für diese Versuche abgegossen, um ein zügiges Arbeiten zu gewährleisten. Die Zugabe von Flüssigkeiten erfolgte mit einer Multipipette, ebenfalls um schnelles Arbeiten zu ermöglichen. Im Falle einer hohen Frequenz von Probenahmen, wurden die Sechs-Well Platten zeitlich versetzt bearbeitet, was bedeutet, dass sich der eigentliche Zeitpunkt t = 0 unterschied. Allerdings betrug dieser Unterschied maximal etwa 1 h. Für diesen Zeitraum wurden eine konstante Zellzahl und ein konstantes Zellvolumen angenommen.

5 Ergebnisse und Diskussion

Dieser Abschnitt wurde den Meilensteinen dieser Arbeit entsprechend untergliedert. In Kapitel 5.1 werden zuerst die Ergebnisse zur Etablierung einer Chromatographiemethode beschrieben und anschließend werden in einem Unterpunkt diese Ergebnisse diskutiert. In Kapitel 5.2 werden die Ergebnisse der Auswahl und Optimierung der Probenvorbereitung beschrieben und in einem Unterpunkt folgt die Diskussion dieser Ergebnisse. Der letzte Abschnitt dieser Arbeit (Kapitel 5.3) befasst sich mit der Untersuchung von Metabolitkonzentrationen unter verschiedenen Kultivierungszuständen, wobei in diesem Kapitel aus Gründen der Verständlichkeit die Diskussion bei den Unterpunkten eingearbeitet ist.

5.1 Etablierung einer Chromatographiemethode zur Messung intrazellulärer Metaboliten

Voraussetzung für die Quantifizierung von intrazellulären Metaboliten in tierischen Zellen war die Etablierung einer geeigneten Methode zur Messung der entsprechenden Substanzen. Aufgrund der anionischen Eigenschaften vieler intrazellulärer Metaboliten aus dem Zentralstoffwechsel unter physiologischen Bedingungen wurden vor Beginn der Arbeit für die Messungen zwei AAC-Anlagen bezogen. Hierbei handelte es sich um die Anlagen DX320 und DX600 (beide Dionex), wobei die chromatographische Trennung bei beiden Anlagen auf Säulen mit quaternärem Ammonium als funktionelle Gruppe vollzogen wurde. Ansonsten unterschieden sich die Anlagen aber deutlich in ihren Komponenten und chromatographischen Eigenschaften.

5.1.1 Anionen-Austausch Chromatographie mit der Anlage DX320

Die Chromatographieanlage DX320 wurde ursprünglich gewählt, um organische Säuren und anorganische Ionen zu messen. Zentrale Bestandteile der Anlage sind die analytische Säule AS11 und die Detektoren (Leitfähigkeit und UV). Die grundsätzliche Eignung dieser Anlage für die Analyse von organischen Säuren und anorganischen Ionen wurde im Vorfeld vom Hersteller der Anlage gezeigt. Erste Optimierungsschritte des Gradientenprogramms wurden bereits von Frau Ralitza Danova durchgeführt, was heißt, dass bereits diverse potentiell intrazellulär auftretende Metaboliten bezüglich ihres Vorkommens in Extraktionsproben und ihres Retentionsverhaltens getestet wurden. Die Standardmischung, die zu Beginn der Arbeit übernommen wurde enthielt folgende Substanzen: Fluorid, Phosphat, Chlorid, Nitrat, Sulfat, Formiat, Pyruvat, Succinat, Malat, α-Ketoglutarat, Fumarat, Citrat, Isocitrat, GAP, 2PG, 3PG, PEP, ADP und ATP. Da sich allerdings die Chromatogramme der Extraktionsproben deutlich von denen der Standardmischung unterschieden, war im weiteren Verlauf sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Anpassung nötig. Da zum damaligen Zeitpunkt noch keine verlässliche Extraktionsmethode gefunden war, war es erforderlich, der Entwicklung der Extraktionsmethode zu folgen und dementsprechend das Gradientenprogramm und den Standard immer wieder der Zusammensetzung der Extraktionsproben anzupassen.

5.1.1.1 Optimierung des Gradientenprogramms zur Elution der Metaboliten

Die Voraussetzung für die Quantifizierung von Metaboliten war die Identifizierung der entsprechenden Substanzen in den Extraktionsproben. Dies sollte durch den Vergleich von Retentions-

zeiten im Leitfähigkeits- und UV-Kanal und durch Standardzugabe zu Extraktionsproben erfolgen. In diesem Prozess wurden im Verlauf der Arbeit über 60 verschiedene, potentiell intrazellulär auftretende Metaboliten chromatographisch auf ihre Retentionszeit getestet. Die Auswahl der getesteten Metaboliten wurde anhand der Literatur getroffen, wobei Metaboliten ausgeschlossen wurden, die grundsätzlich auf der entsprechenden Chromatographieanlage nicht analysiert werden konnten (z. B. lipophile Metaboliten). Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 5-1 dargestellt. Zusätzlich zu den hier erwähnten Aminosäuren, wurden 16 weitere Aminosäuren getestet, die allerdings nicht detektiert werden konnten. Eine ganze Reihe von Metaboliten war unter den genutzten Chromatographiebedingungen nicht stabil, so dass mehrere Fragmente der Substanzen in den Chromatogrammen gefunden wurden. Die Metaboliten Acetyl-CoA, NAD^+, GAP und DHAP sind mit der beschriebenen Methode nicht zu quantifizieren, da sie unter basischen Bedingungen zerfallen. Andere Substanzen sind generell instabil, wie z. B. Erythrose-4-Phosphat (E4P), NADH, Oxalacetat [234]. Aus diesem Grund war bereits im Vorfeld der Versuche mit einer eingeschränkten Quantifizierungsmöglichkeit dieser Metaboliten zu rechnen und eine Fragmentierung zu erwarten. Für den Fall, dass diese Metaboliten quantifiziert werden sollten, müsste somit eine andere Methode zum Einsatz kommen. Bei Injektion von *cis*-Aconitat wurde auch immer ein Peak für *trans*-Aconitat gefunden, was auf eine Verunreinigung bzw. Umsetzung des *cis*-Aconitat hindeutet. Dieses Phänomen wurde aber bereits von Lu et al. (2003) berichtet [33]. Als problematisch stellte sich auch die Trennung von UMP, UDP-Glucose (UDP-Glc) und UDP-Galactose (UDP-Gal) heraus. Alle drei Substanzen eluierten zur gleichen Retentionszeit, wobei allerdings UDP-Glc einen zweiten Peak lieferte, der unmittelbar nach dem Hauptpeak eluierte. Dieser Peak erlaubte zumindest eine getrennte Quantifizierung für UDP-Glc.

Die Optimierung des KOH-Gradienten erfolgte in zahlreichen Schritten. Mit der Identifikation von weiteren Metaboliten in den Extraktionsproben wurde der Gradient derart verändert, dass eine möglichst gute Trennung der vorhandenen Peaks erreicht werden konnte ohne die Dauer des Chromatographielaufs unnötig zu verlängern. Der gesamte Vorgang war ausschließlich empirisch geprägt und es wurde ein flacher Gradient verwendet, wo eine hohe Trennleistung nötig war und ein steiler Gradient, wo keine Substanzen eluierten. Die Dauer eines Chromatographielaufs konnte durch die ungewöhnliche Maßnahme, negative Gradienten (abnehmende KOH-Konzentration) zu verwenden, um mehrere Minuten verkürzt werden, ohne die Trennung zu verschlechtern. Nur durch die Verwendung des Eluenten-Generators konnten negative Gradienten genutzt werden, da dieses Gerät eine sehr schnelle Einstellung des Gradienten erlaubt. Abbildung 5-1 zeigt den KOH-Gradient, der zu Beginn der Arbeit verwendet wurde, die dazugehörigen Chromatogramme für Leitfähigkeits- und UV-Kanal und den verbesserten Gradienten und mit entsprechenden Chromatogrammen.

Tabelle 5-1: Zusammenfassung der chromatographisch untersuchten Metaboliten (Trennung mittels des verbesserten Gradienten; s. Abbildung 5-1)

Analyt	Retentionszeit[a]	SD[b]	UV[c] *220*	UV[c] *260*	Warum nicht im Standard[d]	koeluierend mit
2PG*	38,80	0,07	n	n		3PG
3PG*	38,60	0,07	n	n		2PG
Acetat*	5,15		n	n		Lactat, Hydroxybutyrat
Acetoacetat	5,30		j	?	ko	
Acetyl-CoA	Fragm		j	j	ns$^+$/nd	
ADP*	48,94	0,03	j	j		
AMP*	30,94	0,09	j	j		R5P
Asp	11,72		n	n	sq	
ATP*	54,01	0,02	j	j		
cAMP	16,25		j	j	nd	
CDP*	41,56	0,15	j	j		Citrat
Chlorid*	6,92	0,01	n	n		
cis-Aconitat*	45,15	0,07	j	j		PEP
Citrat*	41,34		n	n		CDP
CMP*	19,26	0,20	j	j		Malat
CTP*	51,62	0,02	j	j		
dATP	53,70		j	j	nd	
dCTP	50,60		j	j	nd	
dGTP	58,00		j	j	nd	
DHAP	Fragm		?	?	ns$^+$/nd	
dTTP	55,10		j	j	nd	
E4P	Fragm		?	?	ns	
F1P	23,20		j	n	*hinzuzufügen*$^+$	
F1,6bP*	50,95	0,04	n	n		
F6P*	28,18	0,08	n	n		
FAD	Fragm		j	j	ns/nd	
Formiat*	5,50		n	n		
Fumarat*	27,52	0,07	j	j		
GAP	Fragm		n	n	ns$^+$	
GDP*	55,42	0,02	j	j		
Glu	11,05		n	n	sq	
G1P	10,80		j	n	nd	
G6P*	26,51	0,11	n	n		
GMP*	50,57	0,02	j	j		PPi
GTP*	58,40	0,02	j	j		
Hydroxybutyrat	5,18		n	n	ko	Acetat, Lactat
Isocitrat*	42,96		n	n		UDP-GlcNAc
α-Ketoglutarat*	24,95	0,17	j	n		Sulfat
Lactat*	5,09		n	n		Acetat, Hydroxybutyrat
Malat*	18,43	0,20	j	n		Succinat, CMP
NAD$^+$	Fragm		j	j	ns$^+$/nd	
NADH	39,00		j	j	nd	
NADP$^+$	Fragm		j	j	ns$^+$/nd	
NADPH	Fragm		j	j	ns/nd	
Nitrat*	10,36	0,02	j	n		
Oxalacetat*	32,22	0,06	j	j		
PEP*	44,97	0,08	n	n		*cis*-Aconitat
Phosphat	35,84		n	n		
PP_i	50,50		n	n		GMP
Pyruvat*	5,81	0,01	j	?		
R5P*	30,88		n	n		AMP
S1,7bP	51,95		n	n	nd	
Succinat*	17,75	0,22	j	n		Malat
Sulfat*	24,43	0,21	n	n		α-Ketoglutarat
trans-Aconitat	47,61	0,04	j	j		
TTP	55,20		j	j	nd	
UDP*	53,36	0,02	j	j		
UDP-Gal	46,44		j	j	ko	UMP, UDP-Glc
UDP-GalNAc*	42,26	0,14	j	j		
UDP-Glc*	43,01	0,15	j	j		UMP, UDP-Gal
UDP-GlcNAc*	46,44		j	j		Isocitrat
UMP*	46,44		j	j		UDP-Gal, UDP-Glc
UTP*	53,36	0,02	j	j		

ad Tabelle 5-1

[a] Mittlere Retentionszeit (min) aller Validierungsmessungen (56); ungefähre Retentionszeit für alle Peaks, die nicht validiert wurden (eine Messung); Fragm.: mehr als ein Peak wurde für diese Substanz gefunden (Fragmentierung)
[b] Standardabweichung (min) der Retentionszeit aus den Validierungsmessungen
[c] UV-Absorption bei der entsprechenden Wellenlänge (nm): n: nein; j: ja; ?: nicht getestet
[d] Grund, warum nicht in der Standardmischung: nd: nicht detektiert; ns: nicht stabil unter den chromatographischen Bedingungen (ns[+]: nicht stabil unter alkalischen Bedingungen entsprechend [234]); ko: Koelution; sq: schlechte Quantifizierung verglichen mit anderen Methoden [19]; [+]: kürzlich identifiziert und bisher nicht dem Standard hinzugefügt;
[*] Chemikalien, die der Standardmischung zugesetzt sind

In Tabelle A 7 im Anhang ist das Gradientenprogramm in Zahlen zusammengefasst. Wie bereits oben erwähnt, konnte keine vollständige Trennung aller Substanzen erreicht werden. Allerdings konnten durch die Verwendung eines UV-Detektors die Peakpaare getrennt quantifiziert werden, bei welchen eine Substanz im UV absorbiert und eine nicht. Um eine eindeutige Aussage bezüglich der Peakreinheit zu erhalten, wurde zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit zusätzlich ein MS-Detektor als weitere Option hinzugefügt. Eine detailierte Beschreibung der Anordnung und der Verwendung des MS-Detektors wird in Punkt 0 gegeben. Zusätzlich zur Anpassung des Gradienten zur verbesserten Peaktrennung wurde der Spülschritt am Ende des Gradientenprogramms auf ca. 6 min verlängert, um eine möglichst lange Säulenlebensdauer zu erreichen. Wie sich im Lauf der Arbeit herausgestellt hat, fand aber trotzdem eine kontinuierliche Verschlechterung der Trenneigenschaften der Säule statt, was laut Hersteller ein normales Verhalten darstellt. Dies bedeutet, dass grundsätzlich die Retentionszeiten mit dem Alter der Säule kürzer werden. Im Normalfall stellte das kein Problem dar, da durch geringfügige Anpassungen des Gradienten (geringere KOH-Konzentrationen) die Retentionszeiten wieder verlängert werden konnten, so dass bei kontinuierlichem Betrieb der Chromatographieanlage eine Säule etwa 6-8 Monate genutzt wurde, was ca. 4000 Injektionen entsprach. Grundsätzlich besteht hier wahrscheinlich ein Zusammenhang zwischen der Probenreinheit bezüglich Verunreinigungen mit Nukleinsäuren bzw. Protein und der möglichen Nutzungsdauer einer Säule. Die Dauer von Injektion einer Probe zu Injektion der nächsten Probe entsprach ca. 70 min. Die große Anzahl von Metaboliten, die in einem Lauf analysiert werden sollten, erlaubte keine kürzere Laufdauer, da sonst die Trennung der Substanzen deutlich verschlechtert worden wäre. Bei Nutzung des Autosamplers bot sich aber ein Messbetrieb von 24 h für 7 Tage in der Woche, weshalb eine kürzere Messdauer bisher nicht erforderlich erschien.

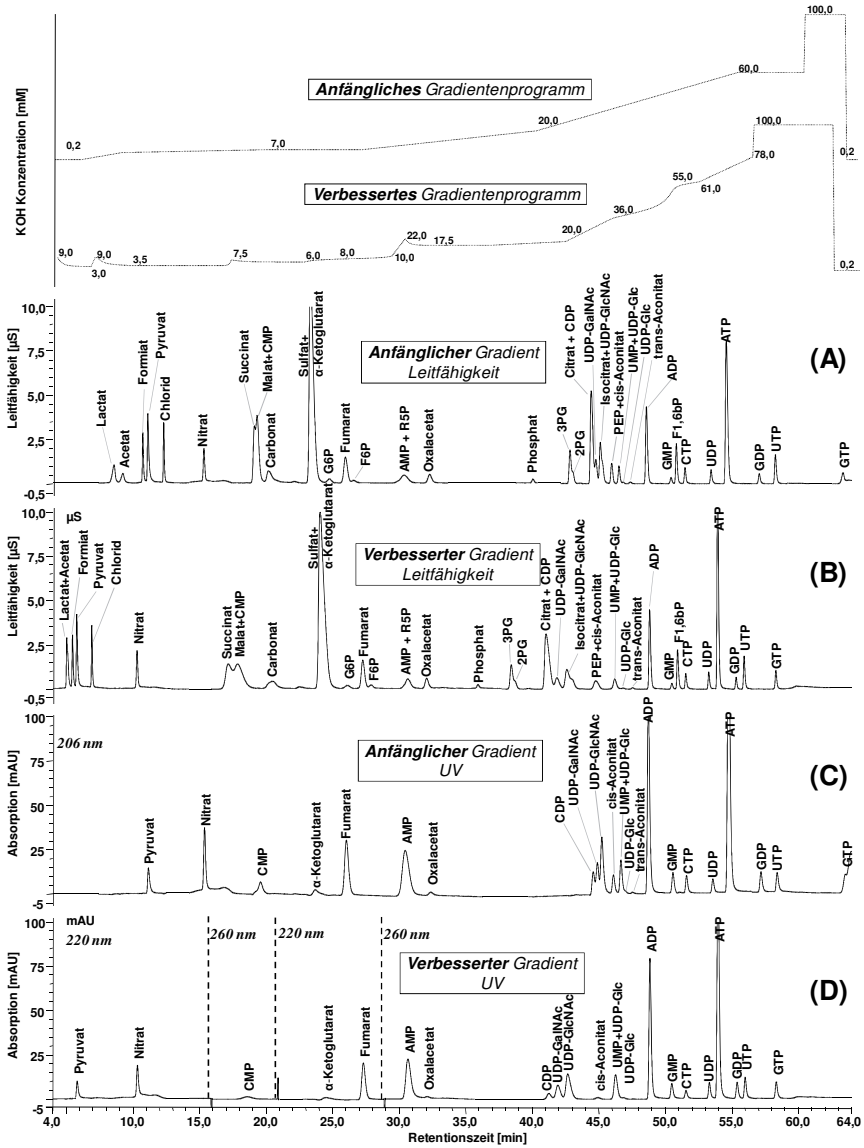


Abbildung 5-1: Gradientenprogramme und entsprechende Chromatogramme einer Standardmischung für die Anlage DX320.*

Zu Beginn genutztes Programm (A) und (C;) verbesserte Gradientenprogramm (B) und (D); Leitfähigkeitsdetektion (A) und (B) und UV-Detektion (C) und (D); Die senkrechten gestrichelten Linien in (D) deuten einen Wellenlängenwechsel an.

**Konzentrationen der einzelnen Substanzen zwischen 3,25 und 104,00 µM; s. Anhang, Tabelle A 6, letzte Spalte*

Wie im untersten Chromatogramm in Abbildung 5-1 zu erkennen ist, wurde während einer Messung die Wellenlänge des UV-Detektors dreimal gewechselt. Grund hierfür war, dass die Detektion einiger organischer Säuren bei 220 nm möglich war (z. B. Pyruvat, Fumarat). Allerdings schwankte die Basislinie bei dieser Wellenlänge relativ stark, während sie bei 260 nm vergleichsweise stabil war. Der Nachteil der Wellenlänge 260 nm war, dass fast ausschließlich die Detektion von Nukleotiden möglich war. Somit sollte also die Option einer Detektion von organischen Säuren nicht verloren gehen, aber trotzdem eine qualitativ hochwertige Quantifizierung von Nukleotiden erreicht werden. Aus diesem Grund wurde bei einer Wellenlänge von 220 nm gestartet und zur Detektion von CMP wurde auf 260 nm gewechselt. Anschließend wurde für die Detektion von Fumarat wieder die Wellenlänge 220 nm eingestellt. Vor der Elution von AMP wurde zuletzt wieder auf 260 nm gewechselt, was die Detektionswellenlänge bis zum Ende des chromatographischen Laufs war. Kurz (0,1 min) nach dem Wellenlängenwechsel wurde zusätzlich ein automatischer Nullabgleich (*autozero*) durchgeführt.

Bei Betrachtung des Chromatogramms in Abbildung 5-1 ist zu erkennen, dass die zu Beginn eluierenden Substanzen (< 5 min), verglichen mit dem Rest des Chromatogramms, deutlich schlechter getrennt wurde. Grund hierfür ist, dass in diesem Bereich des Chromatogramms in Extraktionsproben sehr große Matrixpeaks (Chlorid, Lactat) auftraten, weshalb keine Quantifizierung in diesem Bereich möglich erschien. Deshalb wurde auf die chromatographische Trennung von Lactat, Pyruvat, Formiat und Acetat kein Wert gelegt, zumal Lactat normalerweise mit einem Bioanalysegerät (z. B. YSI 7100 MBS (Yellow Springs Instruments) oder Bioprofile (Nova Biomedical)) quantifiziert wird. Durch die entsprechende Anpassung des Gradientenprogramms konnte die Messdauer um einige Minuten reduziert werden. Falls allerdings Pyruvat gemessen werden soll, bietet sich der von Genzel et al. (2005) beschriebene Gradient an [21].

5.1.1.2 Validierung der Chromatographiemethode

Zur Abschätzung der Qualität der Chromatographiemethode wurde eine Validierung mit Standards in Wasser durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle A 6 im Anhang zusammengefasst. Es wurden sieben äquidistante Verdünnungsstufen zur Kalibrierung gewählt. Von jeder Konzentration wurden jeweils acht unabhängig verdünnte Lösungen in zufälliger Reihenfolge gemessen. Wie bereits oben erwähnt, konnten viele der zu messenden Substanzen nur entweder mit dem einen oder dem anderen Detektor gemessen werden. Manche Metaboliten jedoch konnten theoretisch in beiden Messkanälen detektiert werden. Welcher der beiden Kanäle bei diesen Metaboliten zum Einsatz kam wurde durch Begutachtung der Homogenität der Varianzen und der Werte für das Bestimmtheitsmaß (R^2) entschieden. Auch um eine Entscheidung zu treffen, ob eine Kalibrierung durch Quantifizierung über die Peakfläche oder Peakhöhe erfolgen soll, wurden diese Qualitätskriterien herangezogen. Bei gleichwertigen Ergebnissen wurde bevorzugt der UV-Kanal und die Peakfläche zur Quantifizierung benutzt. Zur Beurteilung, ob die Varianz im Messbereich homogen war, wurde ein F-Test (P = 99%) für die Varianzen des oberen und unteren Konzentrationsbereich durchgeführt. Im Falle einer nicht-homogenen Varianz wurde eine gewichtete Kalibrierung genutzt. Um

zu entscheiden, ob eine lineare oder quadratischen Regression genutzt werden sollte, wurde der Test nach Mandel (P = 99%) angewendet. Für den Fall, dass eine gewichtete Kalibrierung bei quadratischer Regression nötig gewesen wäre, wurde der Messbereich eingeengt, um komplexe Matrizenberechungen zu vermeiden. Das Detektionslimit (3,3 × Standardfehler der Steigung) war für die meisten Substanzen unterhalb des mikromolaren Bereichs. Das niedrigste Detektionslimit wurde für AMP (0,014 µM) erreicht. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) war für die meisten Substanzen größer als 0,99, was eine gute Anpassung durch die Regression andeutet.

5.1.1.3 Effekte des pH-Wertes auf die Quantifizierung der Metaboliten

Da je nach Probenvorbereitung unterschiedliche pH-Werte in den Proben vorherrschen, war eine Untersuchung des Einflusses auf die Stabilität der Metaboliten in Abhängigkeit vom pH-Wert erforderlich. Es wurden Verdünnungen des Standards sowohl in Wasser als auch in PBS erstellt und wiederholte Messungen der Proben durchgeführt. Dabei wurde ein pH-Bereich von 2-12 untersucht. Hierbei konnte weder in Wasser noch in PBS eine signifikante Zersetzung der Substanzen über 4 Tage bei 4 °C festgestellt werden. Eine Ausnahme bildete Oxalacetat, welches unabhängig von den Bedingungen zerfiel. Die beste Stabilität für Oxalacetat konnte bei pH 12 festgestellt werden, was trotzdem noch zu einem 20-prozentigem Verlust nach 4 Tagen bei 4 °C in PBS führte. Obwohl die Stabilität der meisten Substanzen bei diesem Versuch gezeigt werden konnte, war eine eindeutige Abhängigkeit des Messsignals vom pH-Wert der Probe, unabhängig vom Detektor, zu sehen. So war eine klare Abnahme von sowohl Peakfläche als auch –höhe mit sinkendem pH-Wert zu erkennen. Diese Beobachtung konnte bei unterschiedlichsten Analyten gemacht werden, so auch z. B. bei Nitrat und Sulfat. Abbildung 5-2 zeigt die mittlere Peakfläche von sechs Injektionen über dem pH-Wert beispielhaft für sechs verschiedene Analyten.

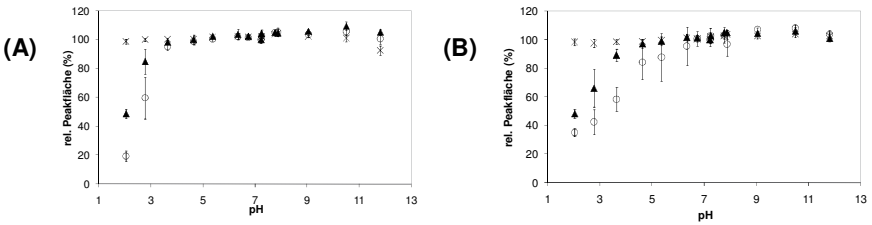


Abbildung 5-2: Einfluss des pH-Wertes der Probe auf die relativen Peakflächen in Chromatogrammen (A): ✕ Succinat, ◢ Nitrat, ○ F16bP (Leitfähigkeitsdetektion); (B): ✕ AMP, ◢ ADP, ○ ATP (UV-Detektion); Konzentration der einzelnen Analyten ist zwischen 3,125 und 100,000 µM; gezeigt ist der Mittelwert aus sechs Messungen, Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Die relative Peakfläche ist berechnet durch Normierung der Peakflächen auf die Peakfläche bei pH 7,2 (jeweils für jede Substanz).

So wies z. B. ATP eine starke Abhängigkeit der Messgröße vom pH auf, was in etwa in einer Halbierung des Signals bei einem pH von 2 (verglichen mit pH 7) resultierte. Von pH 6 bis 12 war das Signal hingegen relativ stabil. Etwas weniger empfindlich zeigten sich die Substanzen ADP, Nitrat und F16bP, deren Signal nur bei einem pH < 5 beeinträchtigt war. Die Metaboliten AMP und Succinat hingegen waren unbeeinflusst vom pH-Wert. Grundsätzlich zeigte sich für alle Nukleotide

ein ähnliches Bild: Triphosphate waren am stärksten von niedrigen pH-Werten beeinflusst, Diphosphate etwas geringer und Monophosphate zeigten einen nahezu konstanten Messwert über den getesteten pH-Bereich. Das Signal der untersuchten organischen Säuren war nur geringfügig abhängig vom pH-Wert der Probe, wie man am Beispiel von Succinat erkennen kann. Diese Beobachtung musste insbesondere bei der Entwicklung einer geeigneten Probenvorbereitung Beachtung finden.

5.1.1.4 Messung von Metaboliten mittels Massenspektrometrie

Im Verlauf der Arbeit, insbesondere bei verbesserter Probenvorbereitung, zeigte sich, dass die Zusammensetzung der Extraktionsproben von hoher Komplexität geprägt ist. Dies bedeutete, dass die chromatographische Trennung der Probe mit dem oben erwähnten Aufbau der Anlage zwar relativ gut war, trotzdem deuteten sich mehrere Koelutionen an. Es war schwer zu gewährleisten, dass die eluierten Peaks auch ausschließlich bzw. zumindest zum Großteil den vermeintlichen Substanzen entsprachen. Insbesondere bei Metaboliten, die nicht über den UV-Detektor zu messen waren, schien das Risiko einer Fehlinterpretation hoch. Als eine Option zur Verbesserung der selektiven Detektion bot sich die Anschaffung eines MS-Detektors an. Mit diesem Gerät sollten die Proben besser charakterisiert werden, die Reinheit der Peaks geklärt werden und eventuell durch Nutzung von selektiven Ionenkanälen (SIM; Single Ion Monitoring) eine getrennte Quantifizierung von koeluierenden Metaboliten ermöglicht werden. Von zentraler Wichtigkeit war hier allerdings die Integration des Geräts in die genutzte Chromatographiesoftware sowie eine robuste Arbeitsweise des Geräts, um einen Routinebetrieb zu gewährleisten.

Kopplung eines MS-Detektors an die Chromatographieanlage

Als Anschaffung bot sich ein Single-Quadrupol-Massenspektrometer aufgrund der relativ hohen Verlässlichkeit im Betrieb. Von der Firma Dionex wurde ein entsprechender Detektor bezogen. Dieser konnte in die Chromatographiesoftware eingebunden werden, wodurch auch eine Steuerung des MS-Detektors möglich war. Weiterhin besitzt dieser MS-Detektor eine Option namens *Cone-Wash*, was bedeutet, dass der Einlasskonus des MS-Detektors kontinuierlich durch ein MeOH/Wasser Gemisch gespült wird, wodurch Verschmutzungen und somit einem Sensitivitätsverlust des Detektors vorgebeugt werden soll. Die Anordnung der bestehenden Anlage wurde leicht verändert. Nach dem UV-Detektor wurde ein externes Ventil eingebaut um ein Zu- bzw. Wegschalten des Eluentenstroms zum MS-Detektor zu ermöglichen. Da in den Chromatogrammen typischer Extraktionsproben mehrere große Matrixpeaks bzw. Verunreinigungen durch anorganische Salze auftraten, sollte so eine unnötige Verschmutzung des MS-Detektors durch Wegschalten bei Elution dieser Verunreinigungen vermieden werden. Ebenso wie die oben erwähnte *Cone-Wash* Funktion, sollte diese Maßnahme ein stabiles Detektionsverhalten des MS-Detektors während längerer Messreihen unterstützen. Das Gerät wurde im Negativ-Modus betrieben, was heißt, dass negativ geladene Moleküle detektiert werden. Eine detaillierte Beschreibung der veränderten Anordnung der Chromatographieanlage ist im Anhang in der Arbeitsanweisung BioLC Anlage DX320 gegeben (s. Anhang).

Identifikation und Verifizierung von Metabolitpeaks

Nach Installation und Anpassung grundsätzlicher Parameter des MS-Detektors wurden diverse Extraktionsproben im Scan-Modus vermessen, was bedeutet, dass das Vorkommen sämtlicher *m/z*-Fragmente von 50 – 800 über den gesamten Chromatographielauf aufgezeichnet wurde. Entsprechend den Erwartungen konnten in Scan-Läufen allen Peaks die vermeintlichen Metaboliten, die der Standardmischung zugesetzt waren, zugeordnet werden. Allerdings zeigte sich auch, dass neben den für die entsprechenden Substanzen typischen Masse/Ladung (*m/z)*-Werten, auch nicht zuzuordnende *m/z*-Werte in manchen Peaks des Leitfähigkeitskanals verborgen waren. Darüber hinaus konnten für einige bislang unbekannte Peaks des Leitfähigkeitskanals charakteristische *m/z*-Fragmente identifiziert werden. Metaboliten konnten diesen Fragmenten bisher nur zum Teil zugeordnet werden. Ein repräsentatives Chromatogramm einer Extraktionsprobe von MDCK-Zellen mit den zugehörigen *m/z*-Werten, die in mehreren Proben auftraten, ist in Abbildung 5-3 gezeigt.

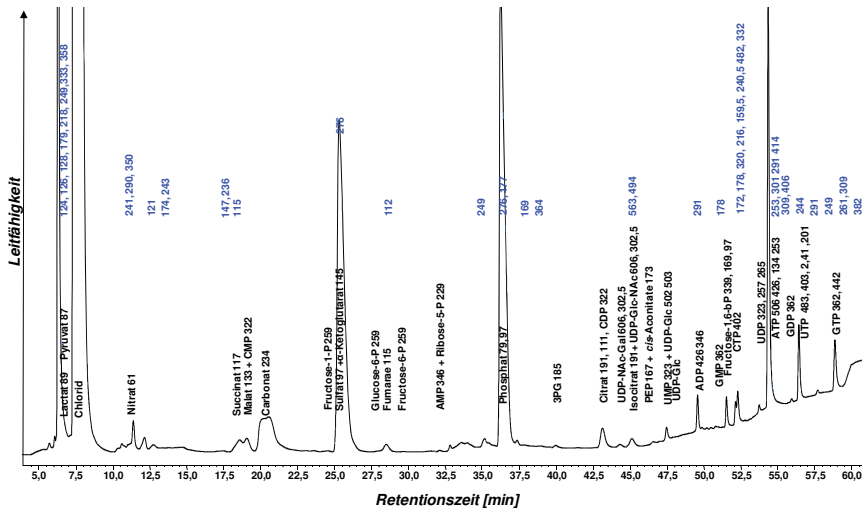


Abbildung 5-3: Darstellung eines repräsentativen Chromatogramms des Leitfähigkeitskanals einer Extraktionsprobe mit den in mehreren Extraktionsproben auftretenden m/z-Fragmenten.
Schwarze m/z-Werte stehen für zugeordnete Werte, wobei der erste Werte das Hauption repräsentiert. Blaue m/z-Werte konnten bisher nicht zugeordnet werden.

Zusätzlich zu den gezeigten Fragmenten traten durchwegs für Nukleosidtriphosphate die *m/z*-Fragmente 79 und 178 auf. Hierbei handelt es sich um Phosphat-Ionen (Monomere und Dimere). Anhand der zahlreichen *m/z*-Fragmente ist zu erkennen, dass eine sehr komplexe Probenzusammensetzung vorlag. Allerdings waren die meisten *m/z*-Fragmente nur in geringen Mengen nachzuweisen und die überwiegende Anzahl der *m/z*-Fragmente rührte von den bereits bekannten Metaboliten her. Insbesondere bei den großen Peaks in der Leitfähigkeit (z. B. ATP, ADP, Malat, Citrat, UDP-NAc-Glc) waren zum Großteil (ca. > 90 %) *m/z*-Fragmente der jeweiligen Metaboliten zu finden. Von

einer detaillierten Beschreibung bzw. Diskussion der verschiedenen Fragmente und ihrer Herkunft wird hier abgesehen und auf die entsprechende Literatur verwiesen [171, 183, 193, 195, 198, 200, 240]. Auch nach der anfänglichen Anpassungsphase zur Verifizierung von Metabolitpeaks wurden gelegentlich Scan-Läufe genutzt, um eventuell neu auftretende bzw. nur in geringen Mengen und unter besonderen Umständen auftretende Substanzen identifizieren zu können (nicht gezeigt). So sollte neben der möglichen quantitativen Beurteilung auch eine qualitative Beurteilung der Proben erhalten werden. Allerdings traten für MDCK-Zellen unabhängig vom Zellkulturmedium und den Kultivierungszuständen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, keine größeren qualitativen Unterschiede auf, was heißt, dass die Hauptkomponenten der Proben die gleichen blieben. Da die bis dahin nicht identifizierten *m/z*-Fragmente verglichen mit identifizierten Fragmenten in relativ niedriger Intensität auftraten, wurden nur vereinzelt Versuche unternommen, die Herkunft der Fragmente zu klären.

Optimierung der Single-Ion-Monitoring (SIM) Methode

Da einige Substanzen überlappende Retentionszeitfenster hatten, sollte mittels MS-Detektion eine zweifelsfreie Quantifizierung erreicht werden. Um eine Quantifizierung mit dem MS-Detektor durchzuführen, war es vorteilhaft, den Arbeitsbereich der *m/z*-Werte auf eine kleinere Anzahl von Werten zu beschränken. So können die einzelnen *m/z*-Werte mit einer höheren Wiederholungsrate und somit über einen längeren Zeitraum gescannt werden. Dies führt letztlich zu einer verbesserten Sensitivität, da eine höhere Anzahl eines bestimmten *m/z*-Fragmentes am Ionendetektor eintrifft. Da in diesem Fall die Substanzen, die gemessen werden sollten, bekannt waren, konnte eine Optimierung der Konusspannung des MS-Detektors für die verschiedenen Substanzen mit Standards durchgeführt werden. Dazu wurde die Signalgröße der unterschiedlichen Substanzen in Abhängigkeit der unterschiedlichen Einstellungen begutachtet (nicht gezeigt). Es wurde ein Bereich für die Konusspannung von 35 – 70 V untersucht. Nicht für alle zu messenden Substanzen wurden SIM-Kanäle erzeugt, da insbesondere für Nukleotide mit höherer Konzentration, die Quantifizierung mittels UV-Detektor deutlich robuster und genauer war. Optimale Spannungen für die jeweiligen Substanzen sowie die Zeitfenster, in welchen die verschiedenen *m/z*-Werte gemessen wurden, sind in Tabelle 5-2 zu sehen. Trotz der ausgezeichneten Selektivität des MS-Detektors resultierten einige Metaboliten in den gleichen *m/z*-Fragmenten, wie z. B. G1P, F6P, F1P u.a. Da die hier genannten Metaboliten allerdings unterschiedliche Retentionszeiten auf der genutzten Chromatographiesäule hatten, war dieses Phänomen für $m/z = 259$ unproblematisch. UDP-Glc und UDP-Gal hingegen besitzen die gleiche Masse und eluieren zur gleichen Zeit, weshalb hier nicht unterschieden werden konnte. Unabhängig davon wurden in manchen SIM-Kanälen mehrere Substanzen detektiert wie aus Tabelle 5-2 ersichtlich ist.

Wie bereits oben erwähnt, waren die Retentionszeiten der unterschiedlichen Substanzen im Langzeitbetrieb nicht konstant. Daher musste der Gradient gelegentlich geringfügig verändert werden, um eine Elution in dem aufgeführten Fenster sicherzustellen. In seltenen Fällen wurden auch die Zeitfenster minimal an ein verändertes Retentionsverhalten angepasst. Die Qualität der Messungen mit dem MS-Detektor wurde nicht mit Standards in Wasser, wie für die Chromato-

graphie ohne MS-Detektor (s. 5.1.1.2), überprüft, sondern es wurde eine Schätzung der Varianz basierend auf Mehrfachbestimmungen aus verschiedenen Messsequenzen durchgeführt (s. 5.1.1.5 und 5.2.5).

Tabelle 5-2: Zusammenfassung der mittels SIM-Kanal detektierten Metaboliten mit den entsprechenden charakteristischen m/z-Fragmenten, den entsprechenden chromatographischen Zeitfenstern und den für den MS-Detektor verwendeten Konusspannungen.

m/z	Detektierter Metabolit	Zeitfenster [min]	Konusspannung [V]
87,0	Pyruvat	5,5-7,5	40
115,3	Fumarat	26,0-32,0	40
117,4	Succinat	13,0-22,0	45
133,4	Malat	14,0-23,0	45
145,0	α-Ketoglutarat	23,0-29,0	35
167,0	PEP	42,5-47,5	40
169,0	Fructose-1,6-bP	50,0-54,0	45
173,0	*cis*-, *trans*-Aconitat	42,5-49,5	35
185,0	3PG	36,5-42,0	50
191,0	Citrat, Isocitrat	39,0-45,0	50
229,0	Ribose-5-P	30,0-34,0	45
259,0	Hexose-Phosphate (z.B. G6P, F6P)	22,0-33,0	60
282,0	UDP-Glc, UDP-Gal	46,0-49,5	45
302,5	UDP-Glc-NAc, UDP-Gal-NAc	40,0-46,0	45
323,0	UMP	45,0-49,0	70
346,0	AMP	30,0-34,0	70
362,0	GMP	49,0-56,0	70
402,0	CDP	39,5-44,0	70

5.1.1.5 Bestimmung der Standardabweichung der Chromatographiemethode unter realen Messbedingungen

Im Laufe der Arbeiten zeichnete sich ab, dass für insbesondere die mittels MS-Detektor, aber auch einige mithilfe der anderen beiden Detektoren quantifizierten Metaboliten keine homogene Varianz über den genutzten Messbereich vorlag. Typischerweise ist die Lösung solch eines Problems eine Transformation oder eine gewichtete Regression [250, 253]. Aus praktischen Gründen wurde eine gewichtete Regression verwendet. Eine direkte Bestimmung der Gewichtungsfaktoren war nicht möglich, allerdings war eine deutliche Abhängigkeit der Standardabweichung von der Konzentration zu erkennen. Aus diesem Grund wurde die Annahme getroffen, dass die Standardabweichung proportional zur Konzentration ist und es wurde für die Kalibrierungen einiger Substanzen eine Gewichtung der Form *(1/Konzentration)* eingeführt [195, 250]. Diese Art der Gewichtung war bereits in der Chromatographiesoftware implementiert und konnte so direkt im Routinebetrieb Anwendung finden. Eine weitere Modifikation der Kalibrierung war, dass eine zusätzliche Standardverdünnung (2,5 µL auf 1000 µL) der Kalibrierung hinzugefügt wurde, so dass acht Standardkonzentrationen für jede Kalibrierung genutzt wurden. Des Weiteren wurde für einige Metaboliten die Regressionsgerade durch den Ursprung gezwungen. All diese Maßnahmen wurden eingeführt, um für niedrig konzentrierte Metaboliten eine bessere Quantifizierung zu erreichen. Eine Zusammenfassung der im Normalfall genutzten Kalibrierungstypen ist im Anhang in Tabelle A 8 gegeben. Eine Diskussion der Kalibrierung ist im Abschnitt 0 gegeben.

Um eine bessere Beurteilung der Qualität der Methode zu erhalten, wurde eine Abschätzung der Standardabweichung der Messmethode ähnlich wie von Thompson und Howarth (1976)

durchgeführt [266-268]. Im Laufe der Versuche aus Abschnitt 5.3 wurden für 16 Messsequenzen die acht verschiedenen Standardkonzentrationen der Kalibrierung mehrfach bestimmt (drei- bis siebenfach). So konnte für jede Standardkonzentration jeder Messsequenz ein Mittelwert mit Standardabweichung berechnet werden. Für jede Standardkonzentration wurde der Median der Standardabweichungen aller Messsequenzen ermittelt.

Hierbei zeigte sich für die meisten Metaboliten ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Standardabweichung. Zur Veranschaulichung sind der Median der Standardabweichungen für jede Konzentration über die gemessene Konzentration in Abbildung 5-4 (A) für die Metaboliten ATP und Pyruvat exemplarisch dargestellt. Entsprechend sind in Abbildung 5-4 (B) die relativen Standardabweichungen über die Konzentrationen aufgetragen. Die Standardabweichungen zeigten eine relativ deutliche Abhängigkeit von der Konzentration und dementsprechend resultierten relativ konstante Standardabweichungen für die beiden Metaboliten. Die in Abbildung 5-4 (A) gezeigten Ausgleichsgeraden entsprechen der linearen Regression zur Schätzung der Standardabweichung.

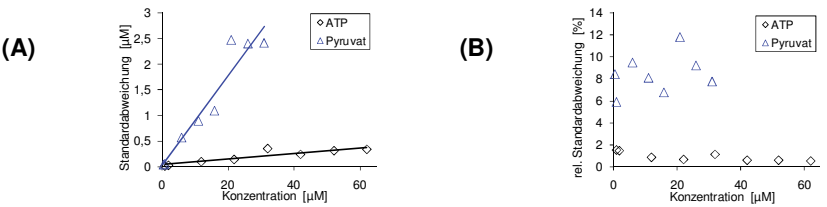


Abbildung 5-4: Standardabweichung (A) und relative Standardabweichung (B) für die Metaboliten ATP (gemessen per UV-Detektion) und Pyruvat (gemessen per MS-Detektion) über die Konzentration im Standard.

Die Punkte repräsentieren den Median der Standardabweichungen aus 16 Messsequenzen der jeweiligen Variablen bei der entsprechenden Standardkonzentration; die jeweiligen Standardabweichungen wurden aus den 3-7 fach bestimmten Messungen jeder Sequenz ermittelt; die Geraden in (A) deuten die lineare Abschätzung der Standardabweichung an.

In Tabelle A 9 im Anhang sind die relativen Standardabweichungen für jede Standardkonzentration, jeden Metaboliten und die entsprechenden Detektoren zusammengefasst. Wie bereits in Abbildung 5-4 (A) beispielhaft angedeutet, zeigten die meisten Metaboliten eine konzentrationsabhängige Standardabweichung. Dies äußerte sich in einer vergleichsweise konstanten relativen Standardabweichung (Abbildung 5-4 (B)). Für die meisten Metaboliten wurde eine lineare, positive Korrelation zwischen Standardabweichung und Konzentration gefunden. Der Mittelwert der relativen Standardabweichung für alle Konzentrationen, alle Detektoren und alle Metaboliten war 5,9%. Zur genaueren Analyse der Fehler kann eine Aufteilung nach Konzentrationen bzw. Detektoren erfolgen. In Tabelle 5-3 ist dies dargestellt.

Bei Betrachtung der relativen Standardabweichungen für die einzelnen Detektoren zeigen sich klare Unterschiede zwischen den Detektoren. Insbesondere der MS-Detektor lieferte eine mittlere relative Standardabweichung von über 9%, was erheblich höher ist, als für die beiden anderen Detektoren (ca. 3%). Die Mittelwerte der relativen Standardabweichungen für die einzelnen Standardverdünnungen zeigten ab Standard 300 einen relativ konstanten Wert von etwa 5%. Die

niedrigeren Konzentrationen (25 und 50) wurden mit erheblich höheren relativen Standardabweichungen (8,4 und 7,3%) bestimmt, wobei dieses Phänomen beim UV-Detektor am stärksten und beim MS-Detektor am schwächsten ausgeprägt war.

Tabelle 5-3: Zusammenfassung der Analyse der relativen Standardabweichungen (%) für die drei Detektoren der Chromatographieanlage DX320 und die acht genutzten Standardverdünnungen.

	Mittelwert aller	Standardverdünnung							
Detektor	**Verdünnungen**	***25***	***50***	***300***	***550***	***800***	***1050***	***1300***	***1550***
LF	2,7	6,6	5,0	2,0	1,9	1,8	1,4	1,5	1,3
UV	3,0	8,2	5,8	2,5	1,8	1,6	1,3	1,5	1,2
MS	9,1	9,2	9,1	9,9	8,6	9,3	10,3	8,4	8,0
Mittelwert aller Detektoren	**5,9**	**8,4**	**7,3**	**6,0**	**5,2**	**5,4**	**5,7**	**4,8**	**4,6**

Konzentrationen der Stammlösung des Standards s. Tabelle 5-4 , 1. Spalte in Klammern; der angegebene Wert jeder Verdünnung entspricht dem Volumen/10 in µL der Stammlösung, welches zu 1000 µL zugegeben wurde, um die Verdünnung herzustellen entsprechend des angegebenen Wertes.

Da eine relativ gute lineare Abhängigkeit von Standardkonzentration zu Standardabweichung bestand, wurde eine lineare Regression zur Abschätzung der Standardabweichung gewählt. Hierbei ist der *y*-Achsenabschnitt als konzentrationsunabhängiger, gerätebedingter Messfehler zu interpretieren. Die Größe dieses Wertes ist ausschlaggebend für den Anstieg der relativen Standardabweichung bei niedrigen Konzentrationen. Je größer der Wert des *y*-Achsenabschnittes im Verhältnis zur Konzentration, desto größer ist bei niedrigen Messwerten die relative Standardabweichung. Für Metaboliten, deren Regression einen negativen Wert für den *y*-Achsenabschnitt aufgewiesen hätte, wurde die Gerade durch den Ursprung gezwungen, da eine negative Standardabweichung keinen Sinn ergibt. Die Steigung der Regressionsgeraden entspricht dem konzentrationsabhängigen Fehler.

5.1.2 Anionen-Austausch Chromatographie mit der Anlage DX600

Die Chromatographieanlage DX600 war konzipiert für die Analyse von Zuckern, phosphorylierten Zuckern und ähnlichen Molekülen. Somit wurde eine Säule des Typs CarboPac PA1 und die Detektion mittels Gepulster-Amperometrie gewählt. Die Elution sollte durch die Anwendung von Natriumacetat und Natronlauge realisiert werden. Die grundsätzliche Nutzbarkeit dieser Anlage war vom Hersteller gezeigt worden, allerdings war die Frage offen, ob eine Anwendung für die Analyse von intrazellulären Metaboliten möglich ist. Somit musste z.B. geklärt werden, ob die Trennleistung der Anlage für die Komplexität des Probengemischs ausreichend ist, die Sensitivität der Detektion gut genug ist, und eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit bezüglich Retentionszeiten als auch Peakflächen und –höhen gegeben ist.

Zu Beginn der Arbeit waren von Frau Ralitza Danova erste Optimierungsschritte bezüglich des Gradienten durchgeführt. Der anfängliche Gradient und die Standardmischung sind in Abbildung 5-5 (A) in einem Chromatogramm zu sehen. Zur Elution wurde zum damaligen Zeitpunkt 0,1 M NaOH eingesetzt. Auch bei dieser Chromatographieanlage war die Verbesserung des Gradienten und die Anpassung der Standardmischung ein iterativer Prozess. Zur Verbesserung der Peaktrennung wurde als weiterer Elutionspuffer 0,05 M NaAcetat eingesetzt. Der Gradient ist in

Abbildung 5-5 (B) gezeigt. Als problematisch stellte sich bei der Optimierung des Standards heraus, dass Aminosäuren ebenfalls detektiert werden. Da diese Metaboliten in relativ hohen Konzentrationen extrazellulär als auch wahrscheinlich intrazellulär auftreten, waren in Extraktionsproben Aminosäuren die Ursache für die meisten Peaks in den Chromatogrammen. Glucose als weitere hochkonzentrierte Substanz im Zellkulturmedium resultierte im größten Peak im Chromatogramm.

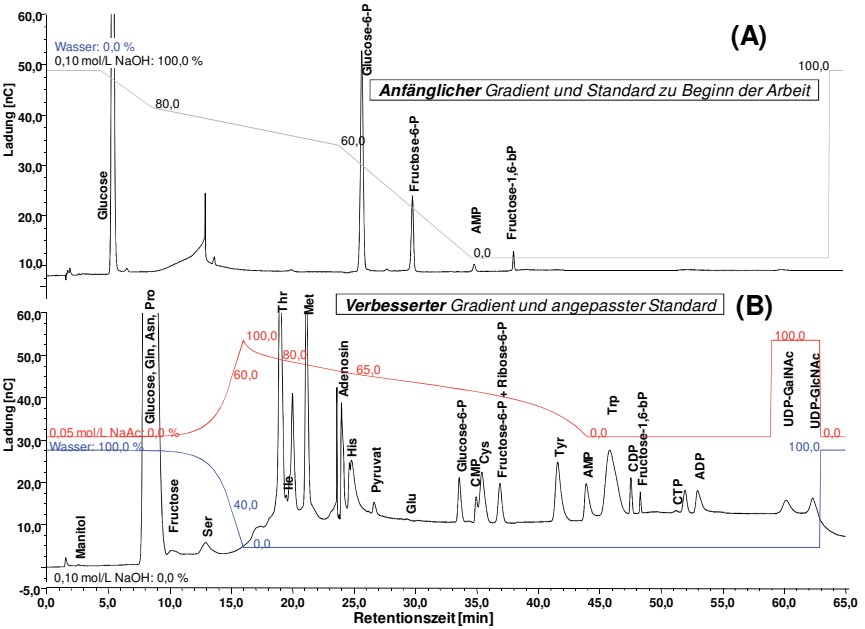


Abbildung 5-5: Gradientenprogramme und entsprechende Chromatogramme der gepulsten amperometrischen Detektion der jeweils aktuellen Standardmischung für die Anlage DX600.*
Zu Beginn genutztes Programm (A); verbessertes Gradientenprogramm (B).
**Konzentrationen der einzelnen Substanzen zwischen 10,5 und 41,0 µM.*

Durch die Peaks von Glucose und Aminosäuren gab es diverse Koelutionen mit den Analyten, die von Interesse waren. Insbesondere der Bereich des Chromatogramms am Anfang war schwer aufzulösen, so dass unklar blieb, welche Substanzen mit Glucose eluierten. Die Verwendung einer AminoTrap-Säule, die Aminosäuren stärker zurückhalten sollte, als andere Analyten, brachte keine merkliche Besserung, da alle Aminosäuren nur um wenige Minuten später eluierten. Auch eine Modifikation des Spannungsverlaufs am amperometrischen Detektor führte nicht zu einer selektiven Detektion der gewünschten Metaboliten. Da es möglich war, die meisten der gewünschten Metaboliten mit der Chromatographieanlage DX320 zu messen, wurden die Anlage DX600 im weiteren Verlauf der Arbeit nicht mehr genutzt.

5.1.3 Diskussion der etablierten Chromatographiemethode

Eine Etablierung einer chromatographischen Methode zur Analyse von intrazellulären Stoffwechselprodukten war für die hier vorliegende Arbeit zwingend erforderlich. Hierfür wurden zwei verschiedene AAC-Anlagen auf ihre Nutzbarkeit untersucht bzw. optimiert.

5.1.3.1 Etablierung der Chromatographiemethode mit der Anlage DX320 und Identifikation der Metaboliten

Um eine aussagekräftige Analyse von intrazellulären Stoffwechselprodukten mit der AAC zu erreichen, mussten zu Beginn der Arbeit möglichst viele Metaboliten in den Extraktionsproben identifiziert werden und den entsprechenden Peaks in den Chromatogrammen zugeordnet werden. Durch das unter 5.1.1.1 beschriebene Verfahren konnte aber keine vollständige Zuordnung bzw. Identifikation erreicht werden, da typischerweise zum einen erhebliche Konzentrationsunterschiede der Substanzen in den Proben auftraten und zum anderen verbunden mit Koelutionen, manche Substanzen gänzlich verborgen blieben.

Ein grundsätzliches Problem bei der Identifizierung von Metaboliten anhand von Retentionszeiten ist, dass auch bei langen Chromatographieläufen Koelutionen von verschiedenen Substanzen auftreten. Die in Tabelle 5-1 aufgeführten Koelutionen sind sicherlich keine Ausnahme und bei entsprechender Untersuchung weiterer Metaboliten würden wahrscheinlich zusätzlich Koelutionen zu finden sein. Des Weiteren ist es nicht möglich, alle erdenklichen Metaboliten auf ihr Retentionsverhalten zu testen, sofern sie überhaupt kommerziell zu beziehen sind. Allerdings waren mitunter die Konzentrationsunterschiede zwischen den Metaboliten in den Extraktionsproben sehr groß, weshalb manche Metaboliten bei Koelutionen sicherlich vernachlässigt werden könnten. Eine gute Möglichkeit zur qualitativen Unterscheidung lieferte in dieser Arbeit die Nutzung des UV-Detektors, wodurch insbesondere Nukleotide selektiv bei 260 nm detektiert wurden. Lu et al. [33] untersuchten intrazelluläre organische Säuren von CHO-Zellen mit einer ähnlichen AAC-Anlage und verzichteten auf die UV-Detektion, was eine hohe Gefahr für eine Fehlinterpretation birgt, da organische Säuren teilweise mit Nukleotiden koelueren. Wie in Tabelle 5-1 gezeigt, trat in den hier durchgeführten Arbeiten z. B. für die Metaboliten Citrat, Isocitrat und *cis*-Aconitat eine Koelution mit anderen Stoffwechselprodukten auf. Eine weitere Voraussetzung zur Aufklärung von Koelutionen ist, dass möglichst viele potentiell auftretende Metaboliten auf ihr Retentionsverhalten untersucht werden. Gerade bei *Metabolic Profiling* Studien wurde auf diese Tatsache nicht zwingend geachtet, so setzten Groussac et al. [34] ihrem Standard keine Nukleotide zu, weshalb in diesem Fall eine Koelution der identifizierten Substanzen mit Nukleotiden nicht auszuschließen ist.

Eine deutliche Steigerung der qualitativen Ergebnisse in der hier vorliegenden Arbeit konnte durch die Kopplung des MS-Detektors erreicht werden, da so die Zusammensetzung von einzelnen Peaks genauer überprüft werden konnte. Hierbei zeigte sich, dass der Großteil der Peaks den richtigen Metaboliten zugeordnet war. Ein bestehendes Problem, unabhängig vom MS-Detektor, ist die eingeschränkte Sensitivität der Analyse, da mit sehr großer Wahrscheinlichkeit zahlreiche Metaboliten zwar in den Extraktionsproben vorhanden sind, aber nicht detektiert werden, weil sie

unter dem Detektionslimit liegen. So gibt es in der Literatur Annahmen von bis zu 200 000 Metaboliten in Pflanzen [122] und bis zu 10 000 Metaboliten in tierischen Zellen [123, 132, 269]. Aber selbst bei Metaboliten, die detektiert werden können, ist zu überprüfen, ob diese Substanzen zu quantifizieren sind. Falls dies nicht der Fall ist, wäre trotz Identifizierung des entsprechenden Metaboliten die Information nur qualitativ und so nur eingeschränkt interpretierbar. Darüber hinaus wäre es bei einer Identifikation einer größeren Anzahl von Metaboliten für eine Quantifizierung unverzichtbar, die Qualität der Methode mit Standards der jeweiligen Metaboliten zu beurteilen. Da allerdings bei dieser Arbeit das Interesse auf der Analyse des Zentralstoffwechsels lag, wurden nach der Untersuchung der Analyten aus Tabelle 5-1 weitere Bemühungen zur Analyse von Metaboliten niedrigerer Konzentrationen unterlassen. Die Metaboliten, deren Auftreten in Proben bekannt war, wurden durch Nutzung des SIM-Modus anhand ihrer charakteristischen *m/z*-Verhältnisse detektiert. Dieses Vorgehen garantiert die Reinheit des quantifizierten Peaks.

Insgesamt gesehen, erwies sich das oben beschriebene iterative Vorgehen bei der Entwicklung des Gradientenprogramms, der Identifikation von Metaboliten und der Zusammensetzung der Mischung aus Standards als erfolgreich. So konnte eine relativ gute Trennung der meisten Substanzen erreicht werden, die spätere Überprüfung der Peaks auf ihre Zusammensetzung mittels des MS-Detektors bestätigte die vermuteten Substanzen. Zusätzlich wurden die Konzentrationsbereiche identifiziert, in welchen die verschiedenen intrazellulären Metaboliten nach einer Probenvorbereitung typischerweise auftreten.

5.1.3.2 Validierung der Methode und Bestimmung der Standardabweichung unter realen Messbedingungen

Die Validierung der Methode zeigte, dass für die untersuchten Standards in Wasser gute Analysenergebnisse erzielt werden konnten. Für einige Substanzen existierte auch eine Linearität über einen größeren Konzentrationsbereich und der Messbereich zur Quantifizierung hätte zu höheren Konzentrationen hin erweitert werden können. Z. B. hätten sicherlich die maximalen Konzentrationen für die Nukleotide GTP, UTP und CTP ähnlich gewählt werden können wie für ATP. Der Grund für die Auswahl des Bereichs erfolgte aber anhand der in den Extraktionsproben vorgefundenen Mengen, so dass höhere Konzentrationen nicht von Interesse waren. Die in dieser Arbeit ermittelten Detektionslimits erwiesen sich als vergleichbar mit der Literatur [31, 32]. Dabei war die Herkunft der auftretenden Unterschiede der minimal zu bestimmenden Konzentrationen durch verschiedene Methoden sowohl der Chromatographie als auch der Berechnung der Detektionslimits schwierig auszumachen. Aus diesem Grund wird hier von einer weiteren Diskussion abgesehen.

Wie oben beschrieben, war es im Laufe der Arbeit erforderlich, eine Anpassung der Kalibrierfunktionen durchzuführen. Die Nutzung der durch die Validierung ermittelten Funktionen war im Routinebetrieb zum Großteil nicht anwendbar.

Bei der Anpassung der Kalibrierfunktion mussten einige weitere rationale Gesichtspunkte berücksichtigt werden. Zwar wurden die Standardkonzentrationen an die in Extraktionsproben vorgefundenen Metabolitkonzentrationen angepasst, allerdings befanden sich trotzdem die

Konzentrationen mancher Metaboliten am unteren Ende des Messbereichs. Gerade für diese Metaboliten war es wichtig, dass die niedrig konzentrierten Kalibrierstandards stärker gewichtet wurden, um auf diese Weise eine bessere Bestimmung der Konzentration zu erzielen.

Im Routinebetrieb zeigte sich, dass die unter 5.1.1.2 durchgeführte Validierung kein realistisches Szenario darstellte. Da diese Validierung mit Standards in Wasser und innerhalb einer Messsequenz durchgeführt wurde, waren diese Bedingungen nicht mit typischen Messsequenzen zu vergleichen. In typischen Messsequenzen wurden die Standards in einem PBS-Tricine-Gemisch angesetzt um die Probenmatrix zu imitieren und meist war die Dauer einer Messsequenz zwischen vier und zehn Tage. Darüber hinaus wurde keine Validierung für den Betrieb der Chromatographieanlage mit MS-Detektor durchgeführt.

Aus diesem Grund wurde unter 5.1.1.5 die Standardabweichung der Messungen der einzelnen Standardverdünnungen aus 16 verschiedenen Messsequenzen ermittelt. Dadurch sollte der reale, in einer Messsequenz auftretende Fehler ermittelt werden. Es zeigte sich, dass, im Gegensatz zu der im Vorfeld durchgeführten Validierung, die Varianz für keinen der Metaboliten über den gesamten Messbereich homogen sondern relativ deutlich konzentrationsabhängig war. Darüber hinaus waren die Messfehler deutlich größer, als bei der Validierung bestimmt. Dies lag mitunter sicherlich daran, dass der Messbereich zum Teil niedriger gewählt wurde, als in der Validierung, um grundsätzlich eine Messung zu ermöglichen. Weiterhin waren die Bedingungen bei den Messungen von Proben verändert. Dem Standard wurden, um die Probenzusammensetzung zu imitieren, PBS und Tricine zugesetzt. Zusätzlich waren typische Messsequenzen deutlich länger (> 100 Proben) als die Validierungssequenz. Da innerhalb solcher Messsequenzen gelegentlich geringe Druckschwankungen auftraten, waren die Retentionszeiten dadurch leicht verändert. Während wie oben erwähnt unter den Bedingungen der Validierung (s. 5.1.1.2) eine exzellente Reproduzierbarkeit vorlag, führten die hier erwähnten Veränderungen zu einer etwas geringeren Reproduzierbarkeit, z. B. zu leicht ungleichen Peakformen, was sich negativ auf die Integration der Peaks auswirkte und somit die Quantifizierung verschlechterte.

Als Anhaltspunkt zur Abschätzung der Messfehler ist die Zusammenfassung in Tabelle 5-3 gezeigt. Die Gruppierung über die acht Standardkonzentrationen ist nur bedingt aussagekräftig, da die verschiedenen Metaboliten in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen untersucht wurden. Dies heißt, dass z. B. in der niedrigsten Standardkonzentration verschiedene Konzentrationen der einzelnen Metaboliten vorlagen (0,0625-1,0000 µM). Somit wurde nicht über exakte Konzentrationswerte, sondern über Konzentrationsbereiche gemittelt, obwohl die Standardabweichung konzentrationsabhängig war. Dennoch ist diese Zusammenfassung hilfreich und für eine detaillierte Angabe zu jedem Metaboliten sei auf Tabelle A 9 im Anhang verwiesen. Die gezeigte Abhängigkeit der Standardabweichung von der Konzentration ist ein häufig vorgefundenes Phänomen, weshalb in vielen Kalibrierungsverfahren eine gewichtete Regression zum Einsatz kommt [250, 253].

Bei Betrachtung der relativen Standardabweichungen der einzelnen Detektoren ist zu erkennen, dass UV- und Leitfähigkeitsdetektion eine ähnliche Variabilität aufweisen (ca. 3%, s. Tabelle 5-3). Dem entgegen ist beim MS-Detektor ein deutlich höherer Wert zu finden. Als möglicher Grund sind hier sicherlich prinzipielle Quantifizierungsschwierigkeiten der ESI durch z. B. Matrixeffekte [29, 204] aber auch durch geräteabhängige Schwankungsquellen, wie z.B. nicht konstante Ionisierung, Verunreinigungen am Einlasskonus oder Schwankungen am Elektronenmultiplier zu nennen [270]. Die Abhängigkeit der absoluten Standardabweichung von der Konzentration äußerte sich in einer nahezu konstanten relativen Standardabweichung für alle Detektoren im höheren Konzentrationsbereich. Bei niedrigeren Konzentrationen stieg die relative Standardabweichung für die meisten Metaboliten an. Dies deutet darauf hin, dass zwar ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Standardabweichung vorliegen mochte, aber auch bei einer Konzentration von 0 M, bereits ein Fehler auftrat, was sich bei der Schätzung der Standardabweichung mittels linearer Regression in einem positiven *y*-Achsenabschnitt äußerte.

Die Validierung unter 5.1.1.2 berücksichtigte nicht die Schwankungen, die von Tag zu Tag auftraten. Diese Art des Messfehlers wurde zwar in der Literatur gelegentlich untersucht, allerdings konnte keine ausführliche Untersuchung zur Standardabweichung bzw. Varianz, wie hier durchgeführt, gefunden werden. Aus diesem Grund kann hier kein Vergleich mit der Literatur erfolgen. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte eventuell eine veränderte Kalibrierungstrategie zum Einsatz kommen. Im Laufe der Arbeit deutete sich bereits die Inhomogenität der Varianzen an, insbesondere für die MS-Detektion, so dass eine Gewichtung *(1/Konzentration)* für einige Metaboliten genutzt wurde [195, 250]. Eine Tabelle der zuletzt genutzten Kalibrierungen ist im Anhang (Tabelle A 8) gegeben. Eine weitere Diskussion hierzu ist im Zusammenhang mit der Bestimmung der Standardabweichung der Extraktionsproben unter 5.2.7 gegeben.

5.1.3.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Quantifizierung

In Abbildung 5-2 konnte klar eine Abhängigkeit des Detektorsignals vom pH-Wert der Probe gezeigt werden. Da beide Detektoren in nahezu gleicher Art beeinflusst waren, kann angenommen werden, dass es sich weniger um ein Detektionsproblem, als vielmehr um ein chromatographisches Problem handelte. Möglicherweise führt ein niedriger pH-Wert durch einen hohen Anteil protonierter Analyten zu einem veränderten Retentionsverhalten eines Teils der Analyten und somit zu einer Elution zu einem früheren Zeitpunkt oder sogar im Totvolumen. In der Literatur konnten speziell zu diesem Effekt keine konkreten Hinweise gefunden werden. Dennoch beschreibt Jandik et al. (2000) deutliche Einflüsse des Proben pH-Wertes auf die Analyse von Aminosäuren [271]. Unter anderem wird dort eine Zersetzung der Aminosäuren durch den Einfluss des pH-Wertes beschrieben, was mit einem Auftreten von weiteren Peaks einherging. Da aber in der hier vorliegenden Arbeit das Messsignal durch Erhöhung des pH-Wertes auf den ursprünglichen Wert wieder hergestellt werden konnte, kann eine Zersetzung der Analyten ausgeschlossen werden. Um Probleme bei der Quantifizierung zu umgehen wurde im weiteren Verlauf der Arbeit darauf

geachtet, dass der pH-Wert der Proben am Ende der Probenvorbereitung zwischen 6,8 und 7,5 lag, was sich für die Messung als relativ robuster Bereich auszeichnete.

5.1.3.4 Anwendbarkeit der Anlage DX600

Durch die hervorragende Eignung der Chromatographieanlage DX320 für die Quantifizierung nahezu aller relevanter Metaboliten des Zentralstoffwechsels erwies sich die Nutzung der Chromatographieanlage DX600 nicht als sinnvoll. Nachteile der Anlage DX600 gegenüber der Anlage DX320 waren, dass diverse Koelutionen von vermeintlich interessanten Metaboliten mit Substanzen der Probenmatrix auftraten. Weiterhin bestand eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Messungen. Insbesondere bei längeren Messsequenzen war es durch Schwankungen in den Retentionszeiten mitunter schwierig, Peaks zuzuordnen und eine gleichbleibende Qualität der Peakintegration zu gewährleisten. Durch die hohe Komplexität der Proben und somit die große Anzahl von detektierten Substanzen wurde das Problem verstärkt. Die eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Messungen war sicherlich zum Teil darauf zurückzuführen, dass die Eluenten, im Gegensatz zur Chromatographieanlage DX320, manuell angesetzt wurden. Dabei treten typischerweise gewisse Schwankungen in der Qualität der Eluenten auf und insbesondere bei den Hydroxid-Eluenten wird häufig die Qualität des Eluenten durch aus der Luft adsorbiertes Kohlendioxid beeinträchtigt. Die bessere Qualität von chromatographischen Messungen durch die Nutzung eines Eluentengenerators wurde bereits in der Literatur gezeigt [272, 273].

Eine erfolgreiche Kombination von zwei ähnlichen Chromatographieanlagen, wie die in der hier verwendeten Arbeit genutzten Systemen, ist in der Literatur beschrieben [34]. Hierbei wurden anorganische Ionen und organische Säuren auf einer AS11-Säule und Zuckerphosphate, Nukleotide und Zuckernukleotide auf einer CarboPac PA1-Säule analysiert. Eine mögliche Verbesserung der Nutzbarkeit der Anlage DX600 in der hier vorliegenden Arbeit hätte durch ein anderes Säulenmaterial oder, wie für die Anlage DX320 geschehen, ein selektivere Detektion erreicht werden können. In der Literatur konnte eine erfolgreiche Anwendung einer Kombination von Amperometrischer- und MS-Detektion gezeigt werden [274, 275].

5.1.4 Zusammenfassung der Etablierung einer Chromatographiemethode

Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Chromatographieanlagen (DX320 und DX600) basierend auf dem Prinzip der AAC auf ihre Anwendbarkeit zur Quantifizierung von intrazellulären Stoffwechselprodukten getestet. Die beiden Chromatographieanlagen unterschieden sich im Wesentlichen in der analytischen Säule (DX320: AS11; DX600: CarboPac-PA1) und den Detektoren (DX320: Leitfähigkeit- und UV-Detektion; DX600: Gepulste-Amperometrische Detektion). Unterschiedliche Chromatograpieeluenten und –gradienten wurden untersucht und mehr als 60 potentiell intrazellulär vorkommende Stoffwechselzwischenprodukte bzw. Komponenten des Zellkulturmediums auf ihr Retentions- und Detektionsverhalten für die beiden Chromatographie-anlagen überprüft. Anhand dieser Daten und mit Hilfe der Methode der Standardzugabe konnten zahlreiche Metabolitpeaks in Extraktionsproben aus kultivierten tierischen Zellen zugeordnet

werden. Für die Chromatographieanlage DX320 konnte eine Methode etabliert werden, die eine simultane Analyse von über 30 verschiedenen intrazellulär auftretenden Metaboliten erlaubt. Diese Messmethode wurde mit Standards in Wasser validiert, um die Qualität der Messungen beurteilen zu können. Da sich die Proben aus der Zellkultur als äußerst komplex in ihrer Zusammensetzung erwiesen, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit zusätzlich zu den bestehenden Detektoren (Leitfähigkeit und UV) ein Massenspektrometer an die Chromatographieanlage DX320 gekoppelt. Durch diesen selektiven Detektor sollte eine zweifelsfreie Zuordnung der Metabolitpeaks erreicht werden. Die MS-Detektion wurde optimiert und die Betriebsbedingungen wurden angepasst. Die vorangegangene Zuordnung der Metabolitpeaks konnte mit Hilfe des MS-Detektors anhand des für jeden Metaboliten charakteristischen Masse/Ladungs-Verhältnisses bestätigt werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde der MS-Detektor im *Single-Ion-Monitoring* (SIM) Modus genutzt, um eine selektive Quantifizierung der Metaboliten von Interesse durchzuführen und die Reinheit der quantifizierten Peaks der AAC garantieren zu können. Basierend auf mehrfachbestimmten Verdünnungen des Kalibrierstandards von 16 Messsequenzen wurde eine Varianzschätzung der Messmethode für 29 Metaboliten und die drei Detektoren unter realen Messbedingungen durchgeführt. Die relative Standardabweichung bewegte sich für die unterschiedlichen Metaboliten für die Detektion mit LF und UV bei etwa 3% und mit MS bei etwa 9%.

Für die Chromatographieanlage DX600 konnte eine Methode etabliert werden, die eine Trennung von zahlreichen Stoffwechselprodukten erlaubte. Allerdings war diese Methode bezüglich der Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten, der Peaktrennung und der Quantifizierung der Methode, welche für die Anlage DX320 etabliert wurde, unterlegen. Des Weiteren war kein wesentlicher Informationsgewinn durch eine parallele Analyse mit den beiden Chromatographieanlagen zu erreichen. Aus diesem Grund konnte auf den Mehraufwand durch Nutzung der Anlage DX600 verzichtet werden.

Somit konnte in dieser Arbeit eine robuste, anwenderfreundliche Chromatographiemethode zur Bestimmung von etwa 30 intrazellulär vorkommenden Stoffwechselprodukten ausgewählt und optimiert werden. Diese Methode wurde im weiteren Verlauf der Arbeit genutzt, um eine Optimierung der Probenvorbereitung zur Quantifizierung intrazellulärer Metaboliten durchzuführen. Weiterhin wurden mit dieser Methode kultivierte tierische Zellen entsprechend ihren intrazellulären Metabolitkonzentrationen unter unterschiedlichen Kultivierungszuständen charakterisiert.

5.2 Optimierung der Probenvorbereitung

Eine Voraussetzung für eine sinnvolle chromatographische Quantifizierung intrazellulärer Stoffwechselprodukte ist eine an die Anforderungen angepasste, verlässliche Probenvorbereitung. Eine direkte Verwendung von in der Literatur beschriebenen Verfahren erschien nicht plausibel, da diese Verfahren auf spezielle Anwendungen zugeschnitten wurden. Zahlreiche Vorversuche bestätigten diese Annahme, was sich in nicht zufriedenstellenden Ergebnissen bezüglich der gefundenen Metabolitkonzentrationen und Wiederfindungen äußerte (nicht gezeigt). Aus diesem

Grund wurde in dieser Arbeit ein vierstufiger Optimierungsprozess der Probenvorbereitung durchgeführt. Der erste Schritt hierbei war eine Untersuchung gängiger Extraktionsmethoden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden im zweiten Schritt für zwei Methoden verschiedene Einflussgrößen auf ihre Effekte untersucht. Der dritte Schritt wurde konzipiert, um eine genaue Charakterisierung von wichtigen Einflussgrößen zu erreichen. Auf diese Weise wurden zwei gute Methoden zur Probenvorbereitung entwickelt. Diese wurden anschließend miteinander verglichen Im vierten Schritt wurden durch eine Kombination von beiden Methoden neu entdeckte Probleme durch Enzymaktivitäten behoben.

5.2.1 Untersuchung von in der Literatur häufig genutzten Extraktionsmethoden

Wie oben erwähnt, finden unterschiedlichste Methoden für die Extraktion von intrazellulären Stoffwechselprodukten des Energiestoffwechsels Anwendung. Daher erschien es notwendig, die Eignung der jeweiligen Methoden für die Extraktion der Metaboliten unter den hier vorliegenden Bedingungen, zu überprüfen bzw. eine Vergleichbarkeit der Methoden zu bestätigen. In drei unabhängig durchgeführten Experimenten sollte eine mögliche Nutzung der verschiedenen Methoden bestätigt bzw. widerlegt werden. Zur Beurteilung der Qualität der unterschiedlichen Extraktionsmethoden wurden einerseits die Menge an extrahiertem ATP (gemessen per Lumineszenz-Methode) und andererseits die Verunreinigungen, die bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren, quantifiziert. Ersteres sollte als Maß für die Extraktion und die Solubilisierung von niedermolekularen Metaboliten dienen. Die zweite Messgröße sollte eine Abschätzung der Abreicherung von insbesondere Proteinen und Nukleinsäuren liefern. Diese Eigenschaft der Proben war ein wichtiges Kriterium im Hinblick auf die Nutzung der AAC, da hochmolekulare Verbindungen die Degradierung der Chromatographiesäule beschleunigen. Die beiden Messgrößen wurden gewählt, da sie sowohl einfach, als auch relativ unabhängig von der Probenmatrix bestimmt werden können. Gerade der zweite hier erwähnte Grund war bei diesem Experiment wichtig, da die verschiedenen Methoden ein weites Spektrum an Matrizes einschließen. Für die einzelnen Experimente wurde mit jeder Methode je eine Sechs-Well Platte mit Zellen extrahiert. Der ATP Gehalt wurde für jedes der Einzelexperimente auf den Mittelwert des Experiments normiert, um physiologische Unterschiede zwischen den Experimenten zu kompensieren. Die Werte aller Wells einer Platte wurden gemittelt und der Standardfehler berechnet. Wie in Abbildung 5-6 (A) zu erkennen ist, war die Abreicherung von Substanzen, die bei 280 nm absorbieren, für die meisten Methoden relativ gut. Nur die Methoden „Kochendes H_2O“ (D) und „Zelllyse“ (K) lieferten relativ hohe Werte. Da bei der Methode „Zelllyse“ (K) keine Abreicherung, sondern nur eine Solubilisierung der Zellbestandteile durchgeführt wurde, sind die Absorptionswerte bei 280 nm für diese Methode als ein Maximum anzunehmen. Die Dauer des Kochvorgangs bei der Methode „Kochendes H_2O“ (D) war höchstwahrscheinlich nicht ausreichend, um den Großteil des Proteins oder der Nukleinsäuren zu fällen, was in hohen Werten der Absorption resultierte. Die niedrigsten Werte und somit besten Werte wurde für die Methode „PCS“ (A) erzielt, gefolgt von den Methoden „MeOH/$CHCl_3$“ (I), „Kochendes EtOH“ (C), „Ameisensäure“ (E) und „MeOH/Kochen“ (J). Es ist

anzunehmen, dass die Fällung der Makromoleküle durch die extremen Bedingungen der verschiedenen Methoden bewirkt wurde. Die Schwankungen der Ergebnisse zwischen den drei unabhängigen Experimenten für die *Absorption 280 nm* sind bis auf die Methoden „Kochendes H_2O“ (D) und „Zelllyse“ (K) relativ gering.

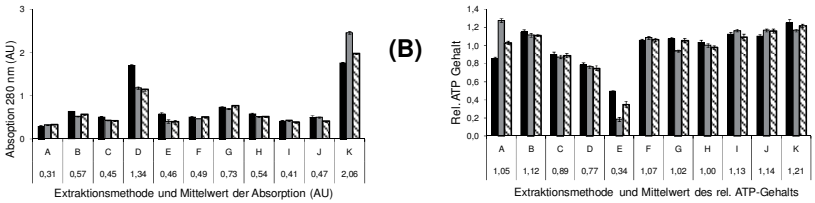


Abbildung 5-6: Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden zur Bestimmung intrazellulärer Metaboliten aus MDCK-Zellen in Sechs-Well Platten bezüglich (A) Absorption bei 280 nm; (B) Relativer ATP-Gehalt pro Zelle.

Normalisiert auf den Mittelwerte aller Extraktionsmethoden eines Experiments; Extraktionsmethoden: A, PCS; B, Kochendes MeOH; C, Kochendes EtOH; D, Kochendes H_2O; E, Ameisensäure; F, Kaltes ACN; G; Kaltes EtOH; H, Kaltes MeOH; I, MeOH/$CHCl_3$; J, MeOH/Kochen; K, Zelllyse. Jeder der drei unterschiedlichen Balken stellt den Wert in einem unabhängigen Experiment dar (Mittelwert aus sechs Wells einer Sechs-Well-Platte; Fehlerbalken deuten den Standardfehler des Mittelwertes an. Die Zahlen unter den Buchstaben repräsentieren den Mittelwert aus allen drei Experimenten.

Das beste Ergebnis (höchster Wert) für die ATP-Menge wurde für die Methode „Zelllyse“ (K) ermittelt. Des Weiteren erwiesen sich die Methoden „MeOH/Kochen“ (J) und „MeOH/$CHCl_3$“ (I) als geeignete Methoden, um ATP zu extrahieren. Die größten Schwankungen zwischen den drei Experimenten für diese Messgröße traten bei den Methoden „PCS“ (A) und „Ameisensäure“ (E) auf, was eventuell Probleme der Robustheit dieser Methoden andeutet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es unterschiedliche Methoden gibt, die die beiden Ziele des Experiments (niedrige *Absorption 280 nm* und hoher Wert für ATP) nahezu äquivalent erreichen können.

5.2.2 Optimierung zwei unabhängiger Extraktionsmethoden

Für den weiteren Verlauf der Arbeit war es wichtig, dass die Extraktionsmethode mit der Analyse mittels AAC kombiniert werden kann. Dies bedeutete, dass die Methode „PCS“ aufgrund der Restlast an Perchlorionen nach der Neutralisierung nicht nutzbar war. Somit wurden die Methoden „MeOH/Kochen“ (J) und „MeOH/$CHCl_3$“ (I), da sie die besten Ergebnisse im vorangegangenen Experiment lieferten und kombinierbar mit der AAC sind, im weiteren Verlauf genauer untersucht. Diese zwei verschiedene Methoden zur Probenvorbereitung wurden optimiert, um sowohl mögliche qualitative und quantitative Unterschiede zwischen den Methoden aufdecken zu können als auch im Falle auftretender Probleme einer Methode, einen alternativen Weg zu haben.

5.2.2.1 Fraktioneller faktorieller Versuchsplan zur Optimierung

Diese Serie an Experimenten sollte dazu dienen, die Effekte einiger Einflussgrößen der Methoden auf die Extraktionsqualität aufzuklären. Dazu wurden die beiden Methoden „MeOH/Kochen“ und

„MeOH/$CHCl_3$“ in unabhängigen Versuchsplänen untersucht. Ein wichtiger Schritt bei der Optimierung der Extraktion ist die Auswahl einer oder mehrerer geeigneter Zielgrößen (z. B. Metabolitkonzentration, Anzahl der Metaboliten, Verhältnisse aus Metabolitkonzentrationen). Im Idealfall sollten alle Metaboliten, an denen man interessiert ist, für die Optimierung quantifiziert werden und diesen Werten entsprechend, die Extraktionsmethode optimiert werden. Abhängig von der Anzahl der Stoffwechselprodukte, kann dies aber ein nahezu unmögliches Ziel sein. Des Weiteren sind aber auch die chemischen und physikalischen Eigenschaften der einzelnen Metaboliten sehr unterschiedlich, was zu einem uneinheitlichen Verhalten während der Extraktion führt. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit vier Marker-Zielgrößen gewählt, anhand derer die Optimierung der Extraktionsprozeduren durchgeführt wurde:

1. Die Summe der Werte aller Nukleotide (*Nukleotidgehalt*), die mittels der AAC gemessen werden konnten (AMP, ADP, ATP, CMP, CDP, CTP, GMP, GDP, GTP, UMP, UDP, UTP, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc und UDP-Glc). Grund hierfür war, dass diese Metaboliten unter normalen Bedingungen nicht im Zellkulturüberstand auftraten und somit ein gutes Maß für die Solubilisierung von intrazellulären Metaboliten darstellten.

2. Die Energieladung (*Energy Charge*; (ATP + ½ ADP)/(ATP+ADP+AMP)); sie wurde gewählt, da Zellen in einem physiologisch gutem Zustand laut Literatur einen Wert zwischen 0,8 und 1 aufweisen [92]. Für den Fall eines niedrigeren Wertes würde das eine Umsetzung von ATP zu ADP und AMP während der Extraktion andeuten.

3. Der Wert für Fructose-1,6-Bisphosphat (*F16bP-Gehalt*), da gemäß der Literatur (z. B. [138]) Zuckerphosphate schwierig zu extrahieren bzw. wiederzufinden sind.

4. Die Absorption bei 280 nm (*Absorption 280 nm*); wie bei der Untersuchung gängiger Extraktionsmethoden sollte so gewährleistet werden, dass kein hoher Verunreinigungsgrad der Proben durch Proteine oder Nukleinsäuren vorlag. Auf diesem Wege sollte eine schnelle Degradation der analytischen Säule der AAC vermieden werden.

Während die ersten drei Zielgrößen bei der Optimierung zu maximieren waren, sollte die vierte Variable minimiert werden. Zur statistischen Auswertung der Experimente wurden die gemessenen Werte auf den Mittelwert des Experiments normalisiert.

Optimierung der Methode „MeOH/Kochen“: Fraktioneller faktorieller Ansatz

Das Extraktionsschema in Abbildung 5-7 (A) zeigt die für relevant erachteten Verfahrensschritte, die in diesem Experiment genauer untersucht werden sollten. Eine Zusammenfassung der untersuchten Einflussgrößen und Niveaus ist in Tabelle 4-3 gegeben. Für die Auswertung wurden die Effekte der Einflussgrößen auf die jeweilige Zielgröße mit Hilfe eines Regressionsmodells, wie unter 3.5.1 beschrieben, dargestellt. Die Messwerte wurden nach dem Minimalen-Fehlerquadrate-Verfahren an ein Polynom erster Ordnung angepasst.

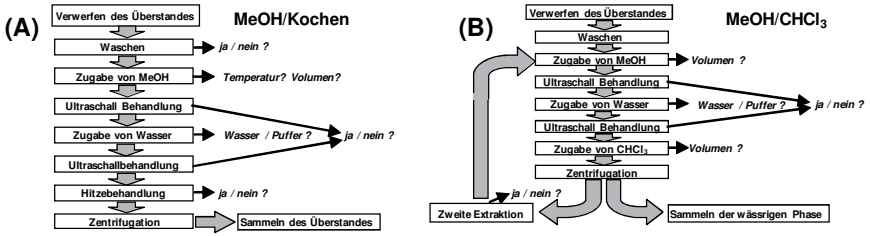


Abbildung 5-7: Schema zur Optimierung der Methoden „MeOH/Kochen“ (A) und „MeOH/CHCl₃“ (B) mit den kritischen Schritten, die genauer untersucht wurden.
Graue Pfeile deuten den Arbeitsverlauf an, schwarze Pfeile und kursiv geschriebene Worte die alternativen Schritte, die getestet wurden.

Die Ergebnisse der Anpassung der gemessenen Daten an die Gleichung sind im Anhang in Tabelle A 10 zusammengefasst. Gemäß der Varianzanalyse war nur das Modell für die Zielgröße *Absorption 280 nm* signifikant. Die Modelle für die anderen Zielgrößen wiesen *p*-Werte auf, die knapp über der Signifikanzgrenze von $p = 0{,}05$ lagen. Eine Verfeinerung der Modelle, also ein Entfernen nicht signifikanter Faktoren, wurde nicht durchgeführt. Die ermittelten Regressionsmodelle wurden im Anschluss genutzt, um Vorhersagen bezüglich des Einflusses der Faktoren auf die Zielgröße machen zu können. Dazu wurde der *Prediction Profiler*, eine Funktion der Software JMPin, eingesetzt (Abbildung 5-8). Zusätzlich war es mit dem Programm möglich, eine kombinierte Optimierung für alle vier Zielgrößen mit Hilfe von *Desirability*-Funktionen [247, 249, 251] durchzuführen.

In Abbildung 5-8 (A) sind in der äußerst rechten Spalte die individuellen *Desirability*-Funktionen dargestellt (grau hinterlegt). Die unterste Zeile deutet die Abhängigkeit der *Overall-Desirability* von den einzelnen Faktoren an (grau hinterlegt). Die weißen Diagramme stellen die Abhängigkeit der unterschiedlichen Zielgrößen von den verschiedenen Einflussgrößen dar.

Wie aus Abbildung 5-8 (A) zu erkennen ist, sollten entsprechend den Berechnungen folgende Extraktionsbedingungen gewählt werden, um den maximalen Wert der *Overall-Desirability* zu erreichen: Die Zellen sollten gewaschen und die Extrakte gekocht werden. Eine Ultraschall-Behandlung ist nicht nötig. Weiterhin sollte Tricine als Puffer benutzt werden und ein MeOH-Volumen von 1600 µL bei -70 °C eingesetzt werden. Diese Extraktionsbedingungen sind in Abbildung 5-8 (A) durch die gestrichelten senkrechten Linien gekennzeichnet.

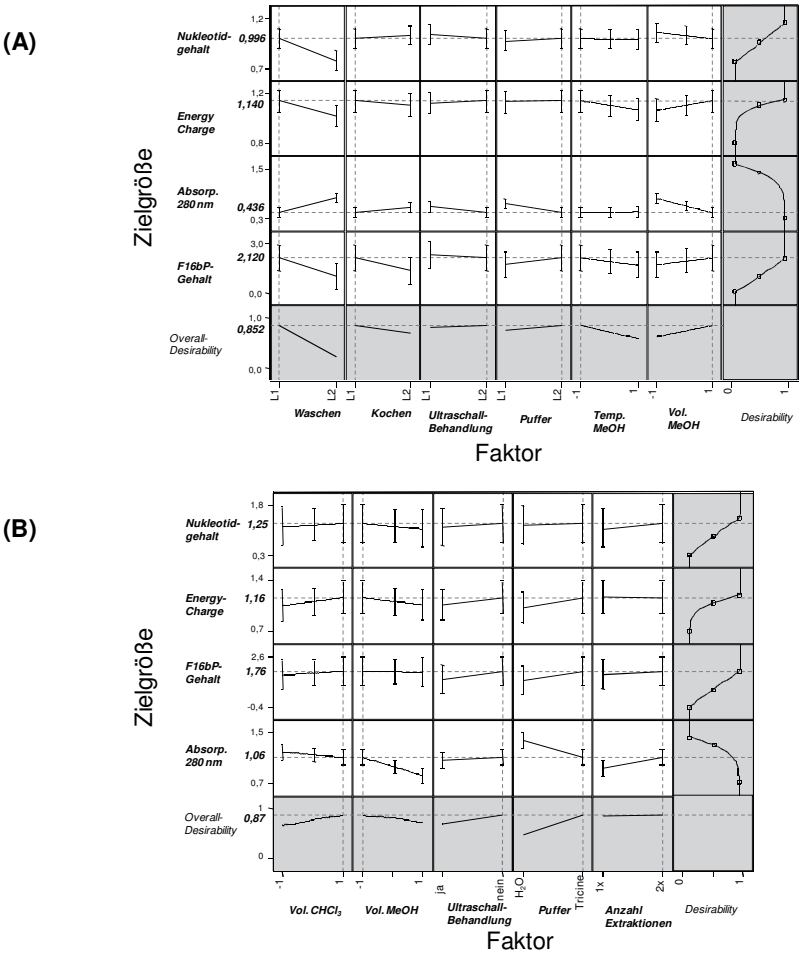


Abbildung 5-8: Optimierung der Methoden „MeOH/Kochen“ (A) und „MeOH/$CHCl_3$“ (B) gemäß der fraktionellen faktoriellen Versuchspläne mit Hilfe des Prediction Profilers (s. a. Tabelle 4-3).

Die verschiedenen Zielgrößen und die Overall-Desirability sind auf der Ordinate aufgetragen. Die fett gedruckten Werte entsprechen der erreichten Werten der jeweiligen Zielgröße bei den optimalen Einstellungen, (s. a. gestrichelte horizontale Linien). Die unterschiedlichen Faktoren und, in der letzten Spalte, die einzelnen Desirabilities sind auf der Abszisse aufgetragen. Hierbei stellen die Werte die möglichen Niveaus der Faktoren dar und die gestrichelten vertikalen Linien den optimalen Wert des jeweiligen Faktors. Die weiß unterlegten Diagramme zeigen die von den Modellen vorhergesagten Einflüsse der jeweiligen Faktoren auf die einzelnen Zielgrößen. Die Diagramme in der letzten, grau unterlegten Spalte zeigen die vom Experimentator gewählten Funktionen für die Desirability. Die Fehlerbalken entsprechen dem 95%igen Vertrauensbereich.

Von den hier empfohlenen Arbeitspunkten waren aber einige nicht signifikant besser als das alternative Niveau ($p < 0{,}05$). Aus diesem Grund wurden für eine Entscheidung in diesen Fällen rationale Gesichtspunkte mit in Betracht gezogen. Die Behandlung mit Ultraschall zeigte nur

minimale, nicht signifikante Effekte auf die Zielgrößen. Aus diesem Grund wurde auf diesen Schritt im Weiteren verzichtet, da so ein zusätzlicher Arbeitsschritt vermieden werden konnte. Die Temperatur des MeOH zeigte zwar keine signifikanten Verbesserungen, -70 °C beeinflusste aber die *Energy Charge* und den *F16bP-Gehalt* positiv und wurde deshalb für weitere Experimente verwendet. Aus den Ergebnissen zum Faktor Puffer konnten keine klaren Aussagen getroffen werden, weshalb in späteren Versuchen eine weitere Untersuchung zu dieser Einflussgröße folgte.

Optimierung der Methode „MeOH/$CHCl_3$“: Fraktioneller faktorieller Ansatz

Für die Methode „MeOH/$CHCl_3$“ wurden fünf relevante Schritte analog zur Methode „MeOH/Kochen“ überprüft (s. Abbildung 5-7 (B)). Die getesteten Niveaus für die unterschiedlichen Faktoren sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst. Nach Durchführung der Extraktionen unter den acht für dieses Experiment erforderlichen Bedingungen, wurden die Ergebnisse an die Gleichung 3-3 angepasst. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in Tabelle A 10 im Anhang dargestellt. Folgende optimale Arbeitspunkte konnten nach der Auswertung identifiziert werden: Das Volumen an $CHCl_3$ sollte groß sein, das Verhältnis aus MeOH/Puffer sollte klein sein, eine Ultraschall Behandlung war nicht nötig, Tricine sollte als Puffer dienen und eine zweite Extraktion sollte durchgeführt werden (s. gestrichelte horizontale Linien in Abbildung 5-8 B). Für die weiteren Experimente mit der Methode „MeOH/$CHCl_3$“ wurde somit kein Ultraschall genutzt und es wurde jede Probe zweimal extrahiert.

Mit diesen Experimenten konnten durch den Einsatz von fraktionellen faktoriellen Versuchsplänen mit einem überschaubaren Aufwand eine große Anzahl von Einflussgrößen untersucht werden. Die Effekte von einer Reihe von Einflussgrößen auf die verschiedenen Zielgrößen konnte geklärt werden. Für andere Faktoren konnten die Effekte jedoch nicht klar eingeordnet werden. Aus diesem Grund wurde zur genaueren Charakterisierung der Extraktionsverfahren eine Versuchsplanung gemäß einem *Central Composite* Design genutzt.

5.2.2.2 *Central Composite* Versuchsplan zur weiteren Optimierung

Theoretische Betrachtungen ließen den Schluss zu, dass einige kontinuierliche Einflussgrößen in dem möglichen Einsatzbereich ein Optimum für die Extraktion besitzen könnten (z. B. Volumen MeOH, Volumen $CHCl_3$, Kochdauer). Dies würde bedeuten, dass, wenn nur die Extremwerte der möglichen Einstellungen (2^k faktorieller Versuchsplan) getestet werden, der optimale Bereich, der zwischen diesen Punkten liegt, nicht gefunden wird. Somit wurde ein dafür geeigneter Versuchsplan (*Central Composite*) gewählt, um die Effekte dieser kontinuierlichen Einflussgrößen zu bestimmen. Jeder Faktor wurde bei diesem Versuchsansatz für fünf unterschiedliche Niveaus getestet.

Optimierung der Methode „MeOH/Kochen“: *Central Composite* Ansatz

Die Einflussgrößen Volumen MeOH, Tricine Konzentration und Kochdauer wurden in diesem Experiment genauer untersucht. Es wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt, da das erste Experiment keine signifikanten Resultate lieferte. Die realen Niveaus für die kodierten

Niveaus -1 und 1 sind in Tabelle 4-4 (A) und (B) gezeigt. Die weiteren Niveaus -1,68, 0 und 1,68 lassen sich, wie unter 3.5.3 beschrieben, aus diesen Werten berechnen. Die beiden Experimente wurden kombiniert und gemeinsam ausgewertet. In einem ersten Ansatz zur Auswertung wurden die experimentell ermittelten Ergebnisse an die Gleichung 3-6 angepasst (nicht gezeigt). Die Begutachtung der Residuen zeigte allerdings eine relativ schlechte Anpassung für die Zielgrößen *Nukleotidgehalt* und *Energy Charge*. Bei genauerer Überprüfung deutete sich an, dass diese beiden Zielgrößen eine Art Sättigungsverhalten in Abhängigkeit der Einflussgrößen aufwiesen. Problematisch hierbei ist, dass ein Polynom zweiter Ordnung nicht in der Lage ist, dieses Verhalten adäquat nachzubilden. Aus diesem Grund wurden die beiden Zielgrößen entsprechend der Gleichung 5-1 für den *Nukleotidgehalt* und der Gleichung 5-2 für die *Energy Charge* transformiert.

$$Nukleotidgehalt_{transformiert} = log_{10}\,(1{,}10 - Nukleotidgehalt_{normalisiert\,max}) \times (-1) \qquad \textbf{5-1}$$

$$Energy\ Charge_{transformiert} = log_{10}\,(1{,}01 - Energy\ Charge_{normalisiert\,max}) \times (-1) \qquad \textbf{5-2}$$

Diese beiden Gleichungen sind empirische Transformationen, wobei die beiden Konstanten 1,10 und 1,01 die Krümmung durch die Transformation definieren. Nach erneuter Anpassung an Gleichung 3-6 wurden drei nicht signifikante Terme (für alle Zielgrößen) der ursprünglichen Gleichung entfernt (*Tricine Konz.* × *Tricine Konz.; Vol. MeOH* × *Tricine Konz.; Kochen* × *Tricine Konz.*). Für eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Anpassung sei auf Tabelle A 11 im Anhang verwiesen. Insgesamt zeigte sich eine akzeptable Anpassung für alle Zielgrößen. Bei der Begutachtung der Residuen fielen keine offensichtlichen Probleme auf. Wie auch in den vorangegangenen Experimenten wurde hier eine Optimierung mittels der *Desirability* durchgeführt. Grundsätzlich wurden die gleichen Funktionstypen für die einzelnen *Desirabilities* gewählt wie im vorangegangenen Experiment (Abschnitt 5.2.2.1), auch wenn die Funktionen der transformierten Zielgrößen verändert erscheinen. Für die Zielgröße *Absorption 280 nm* wurde eine stärker gekrümmte Funktion gewählt, um diese Variable geringer zu gewichten. Typischerweise ist es ausreichend, wenn ein Großteil der Verunreinigungen aus der Probe entfernt ist und ein unterdurchschnittlicher Absorptionswert erreicht wird. Darüber hinaus absorbieren auch Nukleotide bei 280 nm und eine Minimierung der Absorption wäre kontraproduktiv zur Maximierung des *Nukleotidgehalts*. Abbildung 5-9 (A) zeigt die gewählten *Desirability*-Funktionen (graue Spalte) wie auch die ermittelte Abhängigkeit zwischen Faktoren und Messgrößen.

Die gestrichelten vertikalen Linien deuten den empfohlenen Arbeitspunkt an, was einem MeOH-Volumen von 1094 µL, einer Konzentration des Tricine von 3 mM und einer Kochdauer von 7,4 min entspricht. Diese Werte führen, gemäß den Vorhersagen des Programms, zu einer *Overall-Desirability* von 0,84. Für die einzelnen Zielgrößen sollte dies entsprechend der Prädiktionen des Modells zu folgenden Werten (normalisiert auf das gemessenen Maximum) führen: *Energy Charge:* 0.99; *Nukleotidgehalt:* 0,99; *F16bP-Gehalt:* 0,92; *Absorption 280 nm:* 0,88 (s. Abbildung 5-9 (A)). Da diese Werte als zufriedenstellend angesehen wurden, folgte keine weitere Optimierung.

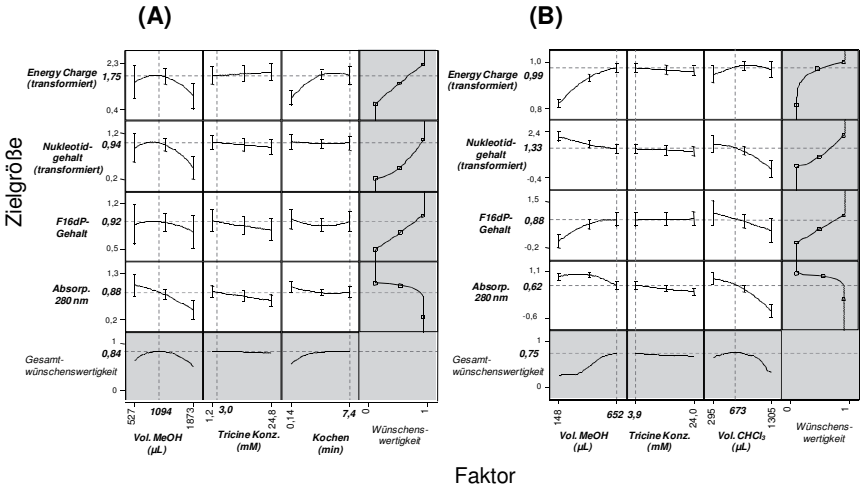


Abbildung 5-9: Optimierung der Methoden „MeOH/Kochen" (A) und „MeOH/CHCl$_3$" (B) gemäß des Central Composite Versuchsplans mit Hilfe des Prediction Profiler (s. a. Tabelle 4-4).
Bezüglich weiterer Erläuterungen sei auf Abbildung 5-8 verwiesen.

Optimierung der Methode „MeOH/CHCl$_3$": *Central Composite* Ansatz

Der Einfluss der drei Faktoren *Volumen MeOH*, *Volumen CHCl$_3$* und *Konzentration Tricine* wurden in diesem Versuch genauer überprüft. Die untersuchten Niveaus sind in Tabelle 4-4 C gezeigt. Wiederum erfolgte eine Anpassung der Daten an eine Gleichung des Typs der Gleichung 3-6. Die Zielgröße *Nukleotidgehalt* konnte nicht zufriedenstellend angepasst werden, weshalb eine Transformation gemäß 5-2 durchgeführt wurde. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist im Anhang in Tabelle A 11 angegeben. Wie auch bei der Optimierung der Methode „MeOH/Kochen" wurden für diese Optimierung der Methode „MeOH/CHCl$_3$" die gleichen *Desirability*-Funktionen wie für das vorangegangene fraktionelle Experiment gewählt. Die Optimierung mit Hilfe der *Desirability*-Funktionen lieferte folgende Arbeitsbedingungen: Volumen MeOH: 652 µL; Volumen CHCl$_3$: 673 µL; Konzentration Tricine: 3,9 mM. Diese Werte korrespondieren mit einer *Overall-Desirability* von 0,75. Für die Zielgrößen sollten sich bei diesen Extraktionsbedingungen folgende Werte (auf das gemessenen Maximum normiert) ergeben: *Energy Charge*: 0.99; *Nukleotidgehalt*: 0,96; *F16bP-Gehalt*: 0,88; *Absorption 280 nm*: 0,62. Der relativ niedrige Wert für die *Overall-Desirability* kann mit einem Blick auf die weißen Diagramme in Abbildung 5-9 (B) erklärt werden. Manche Faktoren hatten einen gegensätzlichen Einfluss auf die Zielgrößen. So lag z. B. das Maximum der *Energy Charge* bei hohen Volumina für MeOH, das Maximum für den *Nukleotidgehalt* hingegen fand sich bei niedrigen Volumina für MeOH. Dennoch konnten unter den angelegten Kriterien der Optimierung anhand von vier Zielgrößen Extraktionsbedingungen gefunden werden, welche in weiteren Versuchen in guten Werten dieser Zielgrößen resultieren sollten.

Die hier gezeigten Versuche erlaubten eine detaillierte Charakterisierung der beiden Extraktionsmethoden bezüglich ihrer Abhängigkeit von den jeweils drei untersuchten Einflussgrößen. Basierend darauf wurden optimale Einstellungen für beide Methoden gewählt. Grundsätzlich sollten somit zwei unabhängig entwickelte, gute Methoden für die Extraktion von intrazellulären Metaboliten aus adhärenten Zellen bereitstehen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein Vergleich der beiden Methoden vorgenommen.

5.2.3 Experimenteller Vergleich der zwei optimierten Methoden

Ein Vergleich der beiden optimierten Extraktionsmethoden basierend auf den bisherigen Ergebnissen erschien nicht zulässig, da insbesondere biologische Schwankungen zwischen den Versuchen höchstwahrscheinlich zu einer Fehlinterpretation geführt hätten. Für den hier durchgeführten Vergleich wurden die Einstellungen der Faktoren der beiden Methoden entsprechend den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche genutzt. Dabei wurden allerdings einige kleinere Veränderungen aufgrund rationaler Entscheidungen eingeführt. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass diese Veränderungen keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis der Extraktion haben. Erstens wurden sämtliche zu pipettierende Volumina aufgerundet, so dass der Einsatz einer Multipipette möglich war. Zweitens wurde für die Methode „MeOH/$CHCl_3$“ das Volumen MeOH abgerundet, da einerseits die Optimierung mittels des fraktionellen faktoriellen Versuchsplans ein niedriges Verhältnis aus MeOH/Puffer empfahl, andererseits hätte ein höheres Volumen MeOH nicht mehr in dem zuvor untersuchten Bereich gelegen, d. h. man hätte basierend auf einer Extrapolation diese Einstellung übernommen. Drittens wurde für die Methode „MeOH/Kochen“ die Kochdauer auf 5,5 min reduziert, da sich in vorangegangenen Experimenten ein deutlicher negativer Einfluss der Kochdauer auf die *Energy Charge* gezeigt hatte, die anderen Zielgrößen aber nur geringfügig von der Kochdauer beeinflusst waren. Somit wurden für die Methode „MeOH/Kochen“ folgende Einstellungen für die Einflussgrößen genutzt: 1100 µL MeOH, 2 mM Tricine (900 µL), Kochdauer von 5,5 min bei 90 °C. Für die Methode „MeOH/$CHCl_3$“ wurden folgende Werte eingesetzt: 700 µL $CHCl_3$, 600 µL MeOH, 4 mM Tricine (500 µL).

Zunächst wurde die Wiederfindung von Metaboliten für beide Methoden getestet, indem Metabolitstandards zu Wells ohne Zellen zugegeben wurde und anschließend die beiden Extraktionsprozeduren durchgeführt wurden.

Im einem folgenden Experiment wurden Zellen parallel mit beiden Methoden extrahiert und die Werte verglichen. Zusätzlich wurden Zellen extrahiert, zu welchen vor Beginn der Extraktion Standard zugegeben wurde, wodurch hierfür ebenfalls die Wiederfindung der Metaboliten bestimmt werden konnte.

5.2.3.1 Wiederfindung zugegebener Metaboliten zu Proben ohne Zellen

Um Verluste zu quantifizieren, die durch rein chemisch-physikalische Ursachen während der Extraktionsvorgänge auftreten, wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Jeweils drei Wells für jede Methode und jede Standardmenge (30 µL und 70 µL, Konzentrationen s. Tabelle

5-4, erste Spalte, Werte in Klammern) wurden hierfür verwendet. Für den Großteil der Metaboliten wurde unabhängig von der Methode oder der Menge an zugegebenem Standard eine Wiederfindung von 100% erreicht. So lag bei Proben ohne Zellen für die Methode „MeOH/$CHCl_3$“ die durchschnittliche Wiederfindung bei 100,6 ± 7,2% für 30 µL Standardzugabe und 98,6 ± 3,9% für 70 µL Standardzugabe (Daten nicht gezeigt). Für die Methode „MeOH/Kochen“ waren die entsprechenden Werte bei 98,4 ± 7,0% und 94,7 ± 5,6% (Daten nicht gezeigt). Grundsätzlich zeigten diese Ergebnisse, dass nur minimale physikalische oder chemische Verluste bei der Extraktion mit den beiden optimierten Methoden auftraten.

5.2.3.2 Extraktion der Metaboliten aus Zellen

Für diesen Versuch wurden Metaboliten von zwei unterschiedlichen Zelltypen (MDCK und Vero) aus Sechs-Well Platten extrahiert. MDCK-Zellen wurden mit einer Zelldichte von $0{,}67 \times 10^6$ Zellen/Well eingesät und anschließend für drei Tage kultiviert, wodurch eine durchschnittliche Zellzahl von $4{,}29 \times 10^6$ Zellen/Well erreicht wurde. Vero-Zellen wurden mit $1{,}60 \times 10^6$ Zellen/Well eingesät und erreichten nach zweitägiger Kultivierung $6{,}40 \times 10^6$ Zellen/Well. Für jede Zelllinie wurden je fünf Sechs-Well Platten mit einer Extraktionsmethode behandelt. Der absolute Wert für jede Zelllinie wurde aus insgesamt zehn Wells aus fünf verschiedenen Platten bestimmt. Die Wiederfindung für sowohl 30 µL als auch 70 µL Standardzugabe wurde ebenfalls jeweils aus zehn Wells aus fünf Platten bestimmt. Im Detail wurde wie folgt verfahren: Für jede Platte wurde zu den Wells 1 und 2 vor der Extraktion kein Standard zugegeben, zu den Wells 3 und 4 wurden 30 µL der Metabolitstandardlösung hinzupipettiert und zu den Wells 5 und 6 wurden 70 µL des Standards gegeben. Nach der Probenvorbereitung und dem Messen wurden von den Werten der Proben mit Standardzugabe die Werte der Proben ohne Standardzugabe subtrahiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5-4 in den ersten beiden Spalten zusammengefasst.

Tabelle 5-4: Vergleich der beiden optimierten Extraktionsmethoden bezüglich Metabolitgehalt pro Zelle und Wiederfindung für MDCK- (A) und Vero- (B) Zellen und zusätzlich der im weiteren Verlauf der Arbeit genutzten, finalen Methode („MeOH/CHCl₃/Kochen", s. Abschnitt 5.2.4) für MDCK-Zellen.

(A) MDCK (Konz. d. Standards; µM)	**MeOH/CHCl$_3$**			**MeOH/Kochen**			**Finale Methode**	
	Gehalt pro Zelle ±SEM[a] [fmol]	Wiederfind. ±SEM [%][a] 30 µl Standard	70 µl Standard	Gehalt pro Zelle ±SEM[a] [fmol]	Wiederfind. ±SEM [%][a] 30 µl Standard	70 µl Standard	Gehalt pro Zelle ±SEM[a] [fmol]	Wiederfind. ±SEM [%][a] 30 µl Standard
3PG (25)	0,09 ±0,00	103,8 ±4,9	102,3 ±1,2	0,10 ±0,01	91,4 ±3,6	95,4 ±2,7	**0,09 ±0,00**	90,9 ±2,0
ADP (200)	0,68 ±0,02	173,8 ±7,9	146,9 ±2,5	0,66 ±0,01	141,6 ±5,4	131,1 ±2,7	**0,51 ±0,02**	98,1 ±1,3
AMP (100)	0,02 ±0,00	103,2 ±6,2	97,5 ±4,3	0,03 ±0,00	87,3 ±1,7	91,4 ±1,6	**0,08 ±0,00**	111,2 ±1,0
AMP+Ribose-5-P (100+25)	0,10 ±0,01	88,4 ±4,9	82,8 ±4,2	0,13 ±0,00	74,8 ±1,9	81,5 ±1,6	**0,15 ±0,01**	105,1 ±1,5
ATP (400)	7,06 ±0,09	74,1 ±6,1	73,7 ±2,7	6,79 ±0,08	65,5 ±5,7	71,4 ±2,4	**7,22 ±0,10**	98,3 ±3,7
CDP (25)	0,02 ±0,00	153,8 ±7,6	125,6 ±4,3	0,06 ±0,00	126,1 ±6,0	121,9 ±3,5	**0,02 ±0,00**	98,4 ±1,9
***cis*-Aconitat (25)**	0	104,8 ±4,7	95,4 ±1,4	0	90,4 ±1,9	90,6 ±0,9	**0**	94,5 ±3,8
Citrat + CDP (335+25)	0,89 ±0,03	101,1 ±4,7	95,8 ±1,1	0,86 ±0,02	89,0 ±2,1	91,3 ±1,6	**0,70 ±0,03**	95,2 ±0,7
CMP (25)	0,01 ±0,00	48,9 ±4,0	60,7 ±3,8	0,02 ±0,00	51,2 ±5,0	57,7 ±2,3	**0,05 ±0,01**	109,3 ±6,0
CTP (40)	0,46 ±0,01	100,3 ±5,8	95,7 ±2,2	0,44 ±0,01	83,5 ±4,7	91,6 ±2,2	**0,44 ±0,01**	96,4 ±4,7
Fructose-1,6-bP (228)	0,43 ±0,02	94,3 ±4,7	95,0 ±1,1	0,45 ±0,03	81,8 ±2,6	87,5 ±1,3	**0,41 ±0,02**	89,8 ±1,3
Fructose-6-P (35)	0,02 ±0,00	90,6 ±4,3	73,8 ±2,7	0,06 ±0,01	85,6 ±3,6	79,9 ±1,6	**0,03 ±0,00**	84,0 ±1,1
Fumarat (50)	0,12 ±0,01	101,4 ±5,0	94,5 ±6,7	0,11 ±0,00	98,8 ±11,0	87,7 ±5,5	**0,13 ±0,01**	93,8 ±2,2
GDP (40)	0,09 ±0,00	137,7 ±7,8	119,7 ±3,7	0,08 ±0,00	112,1 ±3,6	108,2 ±2,3	**0,10 ±0,00**	99,0 ±1,8
Glucose-6-P (35)	0,03 ±0,01	95,5 ±4,8	85,3 ±5,6	0,02 ±0,00	86,8 ±1,5	86,6 ±1,2	**0,02 ±0,00**	84,6 ±2,0
GMP (25)	0	63,0 ±4,3	65,2 ±3,5	0	56,9 ±3,9	55,5 ±1,6	**0,01 ±0,00**	117,4 ±1,4
GTP (79)	1,25 ±0,01	97,1 ±7,0	92,5 ±3,3	1,18 ±0,02	85,2 ±5,8	90,1 ±2,3	**1,26 ±0,02**	102,2 ±3,2
Malat+CMP (200+25)	0,56 ±0,05	102,8 ±6,8	96,2 ±1,5	0,56 ±0,01	88,1 ±2,5	89,6 ±1,5	**0,56 ±0,02**	90,1 ±3,7
PEP+*cis*-Aconitat (25+25)	0,07 ±0,00	73,1 ±4,4	73,0 ±1,7	0,06 ±0,00	71,7 ±1,7	75,9 ±0,8	**0,04 ±0,00**	85,5 ±0,8
Succinat (200)	0,25 ±0,01	94,2 ±5,4	88,5 ±0,9	0,20 ±0,01	81,7 ±2,6	85,3 ±1,1	**0,19 ±0,01**	98,0 ±9,1
UDP (25)	0,04 ±0,00	233,0 ±18,1	175,8 ±15,8	0,03 ±0,00	179,5 ±12,2	170,9 ±8,5	**0,03 ±0,00**	88,2 ±0,7
UDP-Glc (70)	0,39 ±0,01	96,0 ±8,2	97,0 ±5,1	0,41 ±0,03	82,6 ±10,9	90,6 ±4,6	**0,46 ±0,02**	96,0 ±9,5
UDP-GalNAc (60)	0,23 ±0,00	100,6 ±4,6	95,3 ±1,2	0,24 ±0,00	85,6 ±2,6	87,7 ±1,5	**0,22 ±0,01**	100,3 ±1,1
UDP-GlcNAc (200)	0,45 ±0,01	98,9 ±4,8	94,7 ±0,8	0,44 ±0,01	87,8 ±2,2	90,3 ±1,5	**0,44 ±0,01**	96,3 ±1,0
UDP-GlcNAc+Isoc. (200+25)	0,45 ±0,01	97,8 ±4,9	94,2 ±0,8	0,45 ±0,01	87,4 ±2,2	90,2 ±1,5	**0,43 ±0,01**	98,1 ±0,8
UMP+UDP-Glc (75+70)	0,67 ±0,01	71,3 ±5,1	80,0 ±3,0	0,64 ±0,01	62,5 ±3,6	69,7 ±2,3	**0,68 ±0,01**	93,0 ±1,1
UTP (200)	1,31 ±0,01	93,0 ±5,5	92,6 ±3,6	1,25 ±0,02	81,3 ±5,0	85,2 ±2,2	**1,35 ±0,02**	95,6 ±1,2
MITTELWERT	-	103,1±35,4[b]	96,0 ±23,4[b]	-	90,0 ±25,6[b]	91,2 ±22,0[b]	-	**96,8 ±7,7**[b]

(B) Vero (Konz. d. Standards; µM)	**MeOH/CHCl$_3$**			**MeOH/Kochen**		
	Gehalt pro Zelle ±SEM[a] [fmol]	Wiederfind. ±SEM [%][a] 30 µl Standard	70 µl Standard	Gehalt pro Zelle ±SEM[a] [fmol]	Wiederfind. ±SEM [%][a] 30 µl Standard	70 µl Standard
3PG (25)	0,13 ±0,01	109,3 ±6,0	114,2 ±4,2	0,14 ±0,01	112,3 ±14,0	112,1 ±5,4
ADP (200)	0,62 ±0,06	138,0 ±6,3	132,6 ±5,0	0,50 ±0,02	165,2 ±3,9	141,0 ±5,6
AMP (100)	0,10 ±0,02	113,0 ±3,2	107,2 ±2,5	0,04 ±0,00	103,6 ±2,6	98,0 ±3,3
AMP+Ribose-5-P (100+25)	0,10 ±0,02	97,5 ±2,3	92,0 ±2,7	0,03 ±0,01	93,3 ±2,8	91,0 ±3,1
ATP (400)	4,49 ±0,12	89,9 ±8,0	89,3 ±3,5	4,58 ±0,08	93,9 ±7,1	86,2 ±4,2
CDP (25)	0,04 ±0,00	138,8 ±3,7	140,9 ±4,3	0,05 ±0,00	146,7 ±4,0	140,3 ±6,3
***cis*-Aconitat (25)**	0,02 ±0,00	104,2 ±3,0	94,9 ±2,7	0,02 ±0,00	92,1 ±2,4	93,4 ±2,1
Citrat + CDP (335+25)	2,05 ±0,07	104,3 ±4,5	104,1 ±3,5	2,08 ±0,05	108,6 ±5,5	101,7 ±3,8
CMP (25)	0,04 ±0,00	46,0 ±3,2	56,2 ±2,2	0,03 ±0,00	48,5 ±2,0	54,4 ±6,5
CTP (40)	0,50 ±0,02	104,3 ±8,6	105,9 ±5,8	0,50 ±0,01	109,6 ±9,3	99,4 ±5,6
Fructose-1,6-bP (228)	1,25 ±0,07	100,3 ±4,9	102,7 ±3,0	1,24 ±0,03	107,8 ±3,7	100,5 ±3,6
Fructose-6-P (35)	0,06 ±0,01	68,9 ±2,8	47,6 ±4,3	0,06 ±0,00	85,8 ±3,0	77,8 ±1,7
Fumarat (50)	0,20 ±0,01	90,4 ±3,6	83,2 ±11,3	0,19 ±0,01	94,7 ±6,2	95,1 ±4,4
GDP (40)	0,12 ±0,01	119,8 ±5,9	112,9 ±4,1	0,08 ±0,00	137,0 ±4,0	112,6 ±4,7
Glucose-6-P (35)	0,23 ±0,03	118,0 ±7,9	91,2 ±10,4	0,20 ±0,01	140,9 ±9,1	103,1 ±5,7
GMP (25)	0	69,3 ±2,7	64,8 ±1,7	0	67,1 ±2,5	66,8 ±3,2
GTP (79)	1,03 ±0,03	109,7 ±8,8	108,5 ±4,8	1,05 ±0,02	116,9 ±8,0	104,7 ±5,5
Malat+CMP (200+25)	1,02 ±0,05	90,2 ±4,3	90,3 ±2,8	1,05 ±0,06	89,9 ±6,0	86,7 ±4,0
PEP+*cis*-Aconitat (25+25)	0,06 ±0,00	61,6 ±1,5	64,3 ±1,7	0,07 ±0,00	72,8 ±2,3	74,0 ±2,0
Succinat (200)	0	112,1 ±3,0	127,9 ±13,8	0	119,6 ±3,3	122,2 ±6,5
UDP (25)	0,09 ±0,01	229,9 ±19,0	212,6 ±17,3	0,05 ±0,00	256,2 ±13,9	196,2 ±15,9
UDP-Glc (70)	0,97 ±0,09	94,0 ±24,5	106,1 ±12,4	0,93 ±0,03	130,4 ±23,6	111,3 ±8,8
UDP-GalNAc (60)	0,31 ±0,01	94,4 ±4,6	97,6 ±3,6	0,31 ±0,01	103,5 ±4,7	96,0 ±3,9
UDP-GlcNAc (200)	0,62 ±0,02	96,0 ±2,9	97,3 ±2,4	0,64 ±0,01	103,5 ±3,4	98,5 ±3,1
UDP-GlcNAc+Isoc. (200+25)	0,65 ±0,02	98,1 ±2,8	98,0 ±2,3	0,68 ±0,02	104,9 ±3,7	98,7 ±3,1
UMP+UDP-Glc (75+70)	1,65 ±0,06	67,3 ±8,6	79,3 ±5,2	1,63 ±0,06	70,2 ±9,1	77,2 ±5,3
UTP (200)	1,71 ±0,05	91,7 ±5,9	95,6 ±4,7	1,73 ±0,05	101,8 ±7,5	94,3 ±5,2
MITTELWERT	-	102,1±33,3[b]	100,5±31,0[b]	-	109,8±38,7[b]	101,1 ±27,0[b]

[a] *Standardfehler (standard error of the mean) gegeben für die einzelnen Metaboliten*
[b] *Standardabweichung für den Mittelwert der Wiederfindungen*

Die Messungen wurden mit der oben beschriebenen AAC-Methode durchgeführt. In der jeweils ersten Spalte für jede Methode sind die absoluten Werte pro Zelle gegeben. Die zweite und dritte Spalte für die Methoden „MeOH/CHCl$_3$" und „MeOH/Kochen" zeigen die Wiederfindungen nach Zugabe von 30 µL bzw. 70 µL Standard (Konzentrationen s. 1. Spalte, in Klammern). Die zweite Spalte für die finale Methode „MeOH/CHCl^3/Kochen" zeigt die Wiederfindung nach Standardzugabe von 30 µL. Zusätzlich ist der Mittelwert der Wiederfindungen der verschiedenen Metaboliten gegeben.

Bei Betrachtung der gefundenen Metabolitmengen in den beiden Zelllinien ist Folgendes zu bemerken. Für beide Zelllinien konnte kein GMP nachgewiesen werden. Succinat konnte nicht in den Extrakten der Vero-Zellen gefunden werden und *cis*-Aconitat war nicht in den Extrakten der MDCK-Zellen zu detektieren. Um einen besseren Vergleich zwischen den beiden Methoden zu ermöglichen, sind in Abbildung 5-10 (A) und (B) die relativen Mengen (willkürlich auf die Methode „MeOH/$CHCl_3$" normiert) der Metaboliten dargestellt.

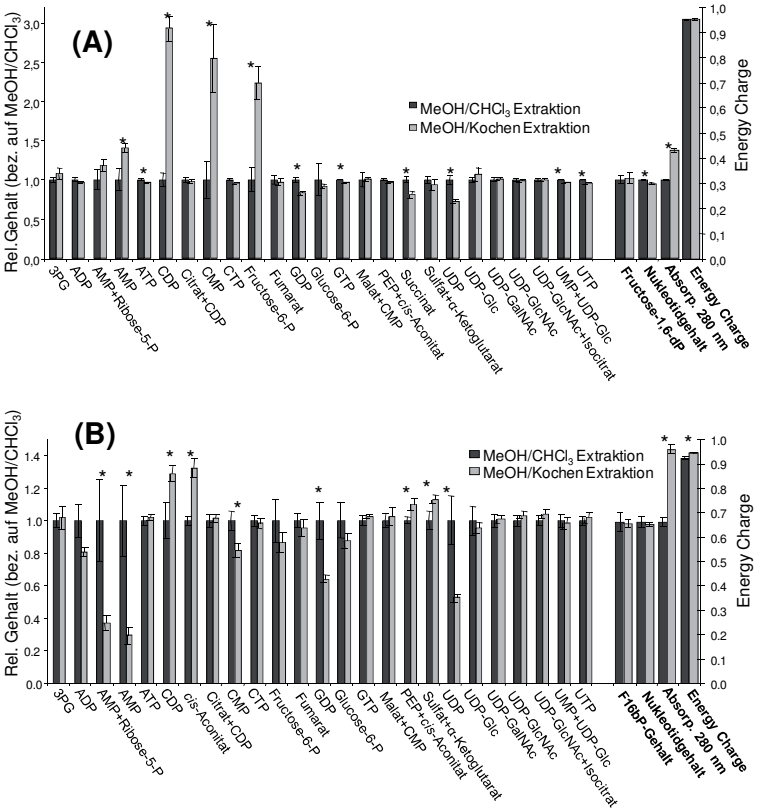


Abbildung 5-10: Vergleich der beiden Extraktionsmethoden für MDCK-Zellen (A) und Vero-Zellen (B) für die verschiedenen Metaboliten, den Nukleotidgehalt, die Absorption 280 nm und die Energy Charge.
Werte wurden auf die Methode „MeOH/$CHCl_3$"normiert; die Fehlerbalken deuten den Standardfehler des Mittelwertes an; die Sterne indizieren signifikante Unterschiede zwischen den Methoden entsprechend einem t-Test ($p < 0,05$).

Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Methoden sind für einige Metaboliten zu erkennen (t-Test, $p < 0,05$, gekennzeichnet mit einem Stern). Trotzdem waren die Ergebnisse für beide Methoden sehr ähnlich und die Größenordnungen für die jeweiligen Metaboliten für beide Methoden gleich. Es ist zu erkennen, dass nur drei Metaboliten sich bei den unterschiedlichen Zelltypen in ihren Tendenzen gleich verhielten, d. h. die Werte für GDP und UDP waren für die

Methode „MeOH/Kochen“ für beide Zelllinien niedriger als für die Methode „MeOH/$CHCl_3$“. Für CDP war das Verhalten umgekehrt. Auf der rechten Seite in Abbildung 5-10 (A) und (B) sind die in den vorangehenden Experimenten genutzten Zielgrößen dargestellt. Nahezu gleiche Werte wurden für die beiden Zielgrößen *Energy Charge* und *F16bP-Gehalt* für MDCK-Zellen ermittelt. Allerdings waren die Werte für die *Absorption 280 nm* und den *Nukleotidgehalt* für die Methode „MeOH/$CHCl_3$“ signifikant besser. Für Vero-Zellen war für die Methode „MeOH/$CHCl_3$“ die *Absorption 280 nm* und die *Energy Charge* signifikant niedriger und der *Nukleotidgehalt* und der *F16bP-Gehalt* waren leicht, aber nicht signifikant, höher.

Die durchschnittliche Wiederfindung lag für alle untersuchten Bedingungen bei 90%, wobei die Standardabweichung bei etwa 30% lag. Die meisten Metaboliten wiesen eine vollständige oder leicht erniedrigte Wiederfindung auf. Beide Methoden zeigten für beide Zelllinien die gleichen Probleme für Nukleotide. Während die Wiederfindung für Tri- und Monophosphate grundsätzlich unter 100% war, waren Diphosphatwerte deutlich über 100%. Da die Summe aus Mono-, Di- und Triphosphaten allerdings zu nahezu 100% wiedergefunden wurde, lag die Vermutung nahe, dass es zu einer Umsetzung von Mono- und Triphosphaten zu Diphosphaten kam. Da dies eine durch Kinasen katalysierte Reaktion darstellt, wurde angenommen, dass aktive Enzyme nach der Zugabe des Standards bis zur Zugabe des Extraktionsmittels hier aktiv sind. In einem Folgeexperiment konnte diese Hypothese jedoch widerlegt werden (Daten nicht gezeigt), denn die Umsetzung der Nukleotide erfolgte auch, wenn der Standard nach der Extraktionslösung zugegeben wurde. In einem weiteren Experiment wurde die Wiederfindung bei Zugabe des Standards nach der kompletten Probenvorbereitung (also nach dem Lösen der Proben, direkt vor der chromatographischen Messung) getestet und es zeigte sich, dass für diesen Weg nahezu 100% der einzelnen Nukleotide wiedergefunden werden konnte (nicht gezeigt). Weitere Untersuchungen deuteten an, dass eine Umsetzung der Nukleotide während der Extraktion stattfand. Bei näherer Betrachtung aller chromatographisch vermessenen Proben war zu erkennen, dass die Konzentrationen von ATP, ADP und AMP für alle Proben sehr nahe bei dem Gleichgewicht mit einer Gleichgewichtskonstante von $K_{eq} = ATP \times AMP / ADP^2 = 0{,}9$ lagen. Dieses Gleichgewicht wurde im Detail von Tewari et al. (1991) untersucht, wobei verschiedenste Bedingungen getestet wurden und sich Gleichgewichtskonstanten von 0,3 bis 1,4 ergaben [276]. In den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit (Tabelle 5-4) ist zu erkennen, dass sich auch bei Proben mit Standardaddition in etwa dieses Gleichgewicht einstellte, während dies bei Proben ohne Zellen nicht stattfand.

5.2.4 Abschließende Modifikation: Entwicklung der finalen Methode „MeOH/$CHCl_3$/Kochen“

Um die erwähnte Enzymaktivität zu unterbinden, die eine Umsetzung von ATP und AMP zu ADP katalysierte, wurden weitere Experimente durchgeführt und kleinere Modifikationen der Methoden eingeführt. Das veränderte Extraktionsschema ist in Abbildung 5-11 dargestellt. Hierfür wurden wichtige Schritte aus den beiden unter 5.2.2.2 optimierten Methoden kombiniert. Für die Überprüfung der Extraktion mit der modifizierten Methode wurden MDCK-Zellen mit einer Dichte

von 2,22 × 10^6 Zellen/Well eingesät und für zwei Tage kultiviert. Dies resultierte in einer Zelldichte von 4,21 × 10^6 Zellen/Well.

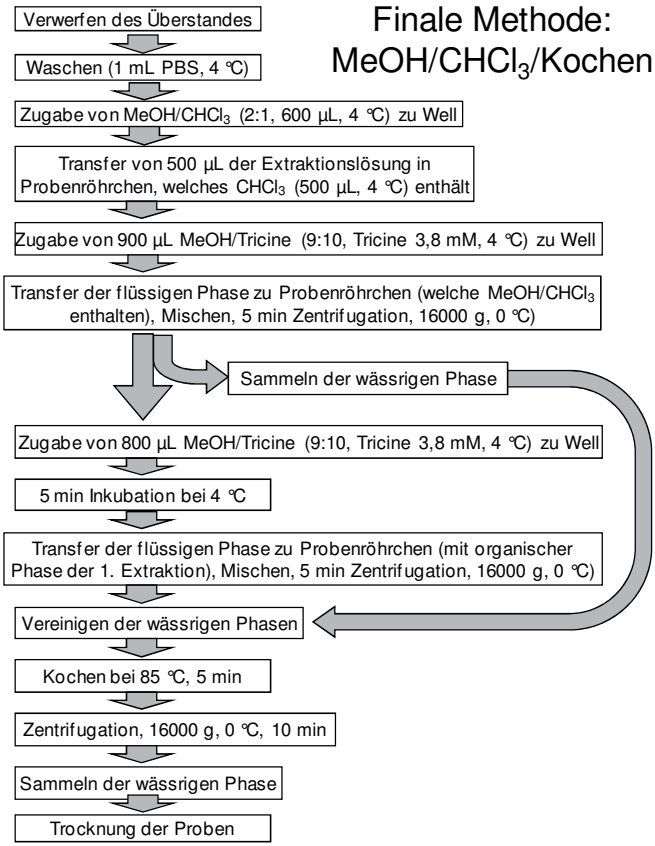


Abbildung 5-11: Schema der abschließend genutzten Methode der Probenvorbereitung nach den erforderlichen Modifikationen zur Vermeidung enzymatischer Aktivitäten.
Durch die frühzeitige Zugabe von MeOH/$CHCl_3$ (2:1 V/V) konnte eine Umsetzung von Nukleosidtri- und Nukleosidmonophosphaten zu Nukleosiddiphosphaten, wie sie für die zwei oben beschriebenen, optimierten Methoden stattfand (s. Abschnitt 5.2.3), vermieden werden. Das Kochen der Proben nach der Vereinigung der wässrigen Phasen konnte verhindern, dass eine enzymkatalysierte Hydrolyse von ATP stattfand.

Der entscheidende Schritt war die Zugabe von MeOH/$CHCl_3$ (2:1 V/V) zu einem frühen Zeitpunkt, wodurch für Nukleotide die Wiederfindungen deutlich näher bei 100% lagen als bei den beiden zuvor optimierten Methoden (s. Abschnitt 5.2.3; Tabelle 5-4). Weiterhin war es wichtig, dass keine zu hohen $CHCl_3$-Konzentrationen (Verhältnis von MeOH/$CHCl_3$ > 2:1; V/V) eingesetzt wurden, da so eine Phasentrennung in den Wells vermieden werden konnte. Andernfalls fand ein Lösungsmittel vermitteltes Auflösen der Sechs-Well Platte statt. Der Kochschritt war nötig, da bei diesen Proben

eine weitere, jedoch andere, enzymatische Aktivität bemerkt wurde. Diese Aktivität bewirkte eine deutliche Umsetzung von ATP zu ADP und AMP und tauchte nach dem Lösen der Proben (also in wässriger Phase) während der Wartezeiten im Autosampler bei 4 °C auf. In Vorversuchen war diese Aktivität bereits aufgefallen. Da aber solch eine Umsetzung die *Energy Charge* vermindert und eine maximale *Energy Charge* als Optimierungskriterium eingesetzt wurde, wurde darauf kein besonderes Augenmerk gelegt. Es wurde davon ausgegangen, dass die Optimierung automatisch zu einer Methode führt, die diesbezügliche nicht anfällig ist. In den beiden unter 5.2.2.2 optimierten Methoden konnte diese Enzymaktivität nicht nachgewiesen werden. Aber nach der früheren Zugabe von $CHCl_3$ trat diese Aktivität wieder auf. Durch den Kochschritt konnte diese Umsetzung von ATP zu ADP und AMP aber vermieden werden.

Für den in Abbildung 5-11 gezeigten Extraktionsprozess wurden somit gute Wiederfindungswerte erreicht. Die Werte für Nukleosiddiphosphate waren nahe 100%, wobei Monophosphate Werte leicht über 100% erreichten. Dies könnte sich auf eine chemische Zersetzung zurückführen lassen. Zur Überprüfung der neuen, modifizierten Methode wurde diese mit den beiden unter 5.2.2.2 optimierten Methoden in einer parallelen Extraktion von identisch kultivierten Sechs-Well Platten verglichen. Die rechte Spalte für MDCK-Zellen in Tabelle 5-4 fasst die Ergebnisse der neuen, modifizierten Methode zusammen. Die im selben Experiment parallel ermittelten Ergebnisse der beiden unter 5.2.2.2 optimierten Methoden sind nicht gezeigt, da diese Ergebnisse den Werten der beiden linken Spalten aus Tabelle 5-4 nahezu vollständig entsprachen. Der Vergleich der absoluten Werte für MDCK-Zellen zwischen den beiden unter 5.2.2.2 optimierten Methoden und der neuen, modifizierten Methode zeigte nur minimale Unterschiede. Dabei sind für die neue, modifizierte Methode die Werte für die Monophosphate höher und Diphosphate niedriger, was auch den besseren Werten für die Wiederfindungen entspricht. Die Berechnung von $K = \mathrm{ATP} \times \mathrm{AMP} / \mathrm{ADP}^2$ lieferte einen Wert von ca. $K = 2$.

5.2.5 Bestimmung der Varianz der Methode

In Abschnitt 5.1.1.2 wurde eine Validierung für die Chromatographiemethode beschrieben. Zur Verbesserung der Schätzung des gerätebedingten Messfehlers wurden unter 5.1.1.5 die Standardabweichungen der Verdünnungen des Kalibrationstandards aus Messsequenzen gemeinsam ausgewertet [266-268]. Diese Daten lieferten aber nur Hinweise zu den gerätebedingten Messfehlern. Zur Abschätzung der gesamten Standardabweichung, die sowohl die biologische Variabilität, die Variabilität durch die Probenvorbereitung und die Variabilität der chromatographischen Messung beinhaltet, wurde die Standardabweichung der Mehrfachbestimmungen der Extraktionsproben verwendet. Wiederum wurde entsprechend der Methode von Thompson und Howarth verfahren [266-268]. In den Versuchen zur Charakterisierung von kultivierten tierischen Zellen unter verschiedenen Zuständen (s. Abschnitt 5.3) wurde für jeden Probenahmezeitpunkt Mehrfachbestimmungen (in Sechs-Well-Platten; zwischen dreifach und zwölffach) durchgeführt. Aus den Schwankungswerten dieser Bestimmungen wurde im Anschluss die Standardabweichung der Methode für die jeweiligen Metaboliten geschätzt. Dazu wurden die Standardabweichung für die jeweiligen Metaboliten von

zwischen 175 und 394 mehrfach bestimmten Proben entsprechend dem Mittelwert jedes Probenahmezeitpunktes aufsteigend geordnet und in sechs, etwa gleich große Klassen eingeteilt. Hierzu wurde die Gesamtzahl der Werte (175-394) durch die Anzahl der Klassen (6) geteilt und je nach Anzahl der Restwerte den einzelnen Klassen beginnend bei Klasse 6 je ein weiterer Wert zugeordnet. Für jede Klasse wurden der Mittelwert des Messwertes und der Median der Standardabweichung bestimmt. Anschließend wurde eine lineare Funktion angepasst. Mit Hilfe dieser Funktion sollte die Standardabweichung in Abhängigkeit vom Messwert geschätzt werden. Tabelle A 12 im Anhang zeigt die Ergebnisse für alle Metaboliten, die drei Detektoren und die sechs Klassen. Eine Zusammenfassung in Form einer Gruppierung über die Detektoren bzw. Klassen ist in Tabelle 5-5 gegeben.

Tabelle 5-5: Zusammenfassung der Analyse der relativen Standardabweichungen (%) für mehrfach bestimmte Extraktionsproben in Abhängigkeit von der Konzentrationsklasse bzw. des Detektors

Detektor	**Mittelwert aller Klassen**	**Klasse**					
		Kl. 1	***Kl. 2***	***Kl. 3***	***Kl. 4***	***Kl. 5***	***Kl. 6***
LF	**10,2**	18,8	11,2	9,3	7,7	7,4	7,0
UV	**7,8**	10,0	7,8	7,4	7,9	6,2	5,8
MS	**14,0**	30,1	12,1	11,9	11,9	11,5	11,5
Mittelwert aller Detektoren	**11,5**	**21,3**	**10,4**	**9,9**	**9,8**	**9,0**	**8,8**

Sämtliche mehrfach bestimmte Probenahmezeitpunkte aus Experimenten nach Etablierung der finalen Extraktionsmethode wurden für die Bestimmung der Standardabweichung verwendet. Die Standardabweichungen wurden entsprechend der Größe der jeweiligen Mittelwerte der Messwerte geordnet. Eine Gruppierung in sechs gleich große Klassen (Kl. 1-Kl. 6) wurde vorgenommen (gleiche Anzahl an Proben ±1); eine detaillierte Zusammenfassung für die einzelnen Metaboliten ist im Anhang in Tabelle A 12 gegeben.

Der Mittelwert der relativen Standardabweichung über alle Klassen, alle Metaboliten und die drei Detektoren betrug 11,5%. Für die einzelnen Detektoren zeigte sich, dass über alle Klassen und alle entsprechend ausgewerteten Analyten die größte relative Standardabweichung bei der MS-Detektion auftrat (14,0%), gefolgt von Leitfähigkeitsdetektion (10,2%) und UV-Detektion (7,8%). Die Mittelwerte der relativen Standardabweichung über alle Detektoren und Metaboliten für die unterschiedlichen Klassen waren mit Ausnahme der ersten Klasse (niedrigster Messwert) bei ca. 10%, wohingegen die relative Standardabweichung der ersten Klasse 21,3% betrug. Auch bei Begutachtung der relativen Standardabweichungen der einzelnen Detektoren über die verschiedenen Klassen zeigte sich, dass durchwegs der erste Wert deutlich größer war als für die fünf weiteren Klassen. Grundsätzlich war auch für die meisten einzelnen Analyten das hier beschriebene Verhalten der relativen Standardabweichung zu beobachten. Des Weiteren waren relative Standardabweichungen von niedrig konzentrierten Metaboliten tendenziell höher. So lag beispielsweise der Mittelwert der relativen Standardabweichung über alle Klassen für CMP (UV) bei ca. 18,2% bei einem mittleren Messwert von 0,26 µM. Für ATP (UV) wurde hier eine relative Standardabweichung von 2,4% bei einem mittleren Messwert von 34,1 µM bestimmt. Im weiteren Verlauf der Arbeit stellen Fehlerbalken bei Konzentrationsverläufen von intrazellulären Metaboliten die Standardabweichungen dar, wie sie mit der in diesem Kapitel bestimmten Gleichung geschätzt wurden.

5.2.6 Bestimmung der Metabolitkonzentrationen durch Abschätzung des Zellvolumens

Im bisherigen Verlauf der Arbeit wurde grundsätzlich die Metabolitkonzentration in Wells von Sechs-Well Platten bestimmt. Unter Bedingungen, in denen sich die Zellzahl im Well während des Versuchsverlaufs nicht ändert, kann man aus diesen Konzentrationen aussagekräftige Informationen erhalten. Für Bedingungen, unter denen Zellwachstum oder eine Reduktion der Zellzahl stattfindet (z. B. Infektion mit Virus) ist zur Ermittlung von Änderungen zellspezifischer Metabolitmengen oder –konzentrationen eine Bezugsgröße erforderlich. Typischerweise bietet sich hier die Zellzahl der Probe als Bezugsgröße an. Die Bestimmung der Anzahl der Zellen, die extrahiert wurden, ist mit dem oben etablierten Extraktionsprotokoll nicht möglich, da die Probevorbereitung mit adhärenten Zellen durchgeführt wird. In der hier vorliegenden Arbeit wurde allerdings davon ausgegangen, dass unter identischen Bedingungen der Zelleinsaat von Sechs-Well Platten, auch identische Zellzahlverläufe auftraten, d. h. dass alle Wells zum gleichen Zeitpunkt während einer Kultivierung auch gleiche Zellzahlen enthielten. Somit wurde die Zellzahl zu einem Zeitpunkt einer Kultivierung bestimmt, indem drei parallel angesetzte Wells trypsiniert und gezählt wurden. Allerdings kann die zellspezifische Metabolitmenge zu Fehlinterpretationen führen, wenn sich das Volumen der Zellen ändert. Somit wurde in dieser Arbeit der Versuch unternommen, das Zellvolumen zu bestimmen.

Prinzipiell bieten sich zwei Möglichkeiten der Bestimmung des Zellvolumens. Entweder werden die Zellen in adhärentem Zustand oder nach Trypsinierung vermessen. Eine Vermessung der Zellen nach Trypsinierung wurde direkt, neben der Zellzahlbestimmung, mit dem Gerät ViCell XR durchgeführt. Hierbei wird für jede Messung von dem Gerät ein durchschnittlicher Durchmesser der gezählten Zellen ermittelt. Aus dem durchschnittlichen Durchmesser der Zellen kann man über die Annahme einer Kugelform mit der Gleichung $V = 4/3\ \pi\ r^3$ ein durchschnittliches Volumen berechnen. Da das Volumen proportional zum $(Durchmesser)^3$ ist, führt die Berechnung des durchschnittlichen Volumens aus dem durchschnittlichen Durchmesser allerdings zu einem fehlerhaften Mittelwert, weil die Verteilung der einzelnen Durchmesser hier von Bedeutung ist. Darüber hinaus änderte sich die Verteilung der Durchmesser während der Kultivierung. Typischerweise war zu Beginn die Verteilung schmal, nahm während der exponentiellen Wachstumsphase an Breite zu und wurde zum Ende der Kultivierung wieder schmaler (Daten nicht gezeigt). Zur Vermeidung der fehlerhaften Abschätzung des Volumens wurden aus den Rohdatendokumenten des ViCell XR (txt-Dokumente) die einzelnen Durchmesser aller gemessenen Zellen verwendet, um hieraus das entsprechende Volumen jeder einzelnen gemessenen Zelle zu bestimmen. Aus den einzelnen Volumina wurde dann der Mittelwert gebildet, der im weiteren Verlauf als durchschnittliches Volumen der Zellen der Probe genutzt wurde. Zur Ermittlung des Gesamtzellvolumens eines Wells einer Sechs-Well Platte wurde das durchschnittliche Volumen mit der zu diesem Well gehörigen Zellzahl multipliziert.

Als weiteres Problem bei der Bestimmung des Volumens zeigte sich eine Abhängigkeit des ermittelten Durchmessers von der Zeitdauer nach Beginn der Trypsinierung. Exemplarisch ist in Abbildung 5-12 (A) das Verhalten der mittleren Zelldurchmesser nach Beginn der Trypsinierung

über die Zeit dargestellt. Grundsätzlich kann eine Zählung erst nach dem vollständigen Ablösen der Zellen erfolgen. Somit muss eine minimale Dauer bis zur Ablösung abgewartet werden. In dem dargestellten Versuch wurden die Zellen mit zehnfach konzentrierter Trypsinlösung behandelt, um eine möglichst schnelle Messung zu erlauben. Deutlich zu erkennen ist, dass nach etwa 15 min ein maximaler Zelldurchmesser zu verzeichnen war. Daraufhin fand bis ca. 40 min eine deutliche Verringerung des Zelldurchmessers statt, wonach ein relativ konstantes Verhalten des Durchmessers gemessen wurde. Um die Schwankungen, die durch diesen Effekt bedingt sind, in folgenden Experimenten gering halten zu können, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit eine Zeitspanne von mindestens 30 min nach Beginn der Trypsinierung abgewartet und frühestens dann die Zellzählung gestartet.

Im Verlauf von mehreren Kultivierungen stellte sich heraus, dass sich das durchschnittliche Zellvolumen während des Wachstums veränderte. Weiterhin war das Volumen für Kultivierungen unter vermeintlich gleichen Bedingungen nicht zwingend gleich. Die in Abbildung 5-12 (B) dargestellten Verläufe der Zelldurchmesser verdeutlichen dieses Phänomen. Während für Kultivierung 1 und 2 der anfängliche Durchmesser bei etwa 17 µm, das Maximum etwa bei 20 µm und der Endwert bei etwa 16 µm lag, war für Kultivierung 3 ein Startwert von ca. 14 µm, das Maximum bei ca. 17 µm und der Endwert bei 14 µm zu finden. Die Vorkultur für Kultivierungen 1 und 2 wurden in T-175 Flaschen durchgeführt, wobei für Kultivierung 3 eine Rollerflasche genutzt wurde.

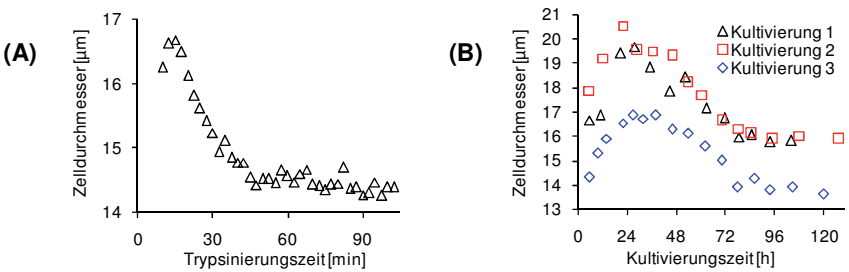


Abbildung 5-12: Beispielhafter Verlauf des mittleren Zelldurchmessers von MDCK-Zellen nach Beginn der Trypsinierung (A) und während der Kultivierung in Sechs-Well Platten in GMEM-Z (B)
Bestimmung mit Hilfe des Gerätes ViCell XR; der mittlere Durchmesser ist ein direktes Resultat der Zellzahlbestimmung mit dem Gerät ViCell XR und wird durch Berechnung des Mittelwertes der einzelnen, gemessenen Zelldurchmesser ermittelt; für den Kultivierungsverlauf (B) wurde eine Trypsinierungsdauer von 30 min verwendet.

Da nicht auszuschließen war, dass durch die Trypsinierung der Zellen ein systematischer Fehler bei der Volumenbestimmung gemacht wurde, sollte mittels Membranfärbung und konfokaler Mikroskopie ein Vermessen der Zellen im adhärenten Zustand erfolgen. Parallel dazu wurde für identisch kultivierte Zellen mit Hilfe des ViCell XR das Volumen im trypsinierten Zustand bestimmt. Mikroskopisch konnten nur die Zeitpunkte 7 h, 30 h und 55 h ausgewertet werden, da spätere Zeitpunkte (im konfluenten Zustand) keine Unterscheidung der Membranen unterschiedlicher Zellen zuließen. Für jeden dieser drei Zustände wurden 50 Zellen mikroskopisch vermessen.

Die hieraus ermittelte Volumenverteilung wie auch die mittels des ViCell XR ermittelte Verteilung sind in Abbildung 5-13 dargestellt.

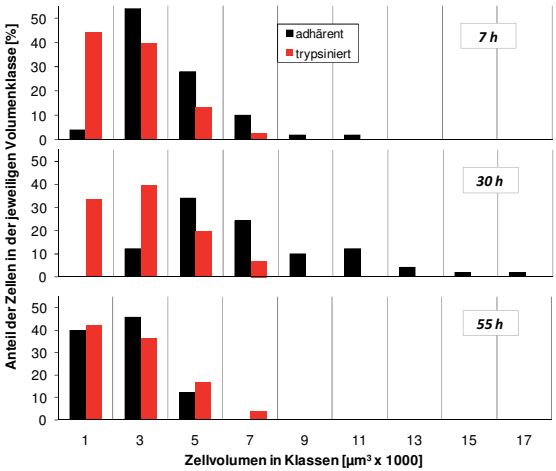


Abbildung 5-13: Histogramme für Zellvolumina zu den Zeitpunkten 7 h, 30 h und 55 h nach Zelleinsaat für zwei unterschiedliche Methoden der Bestimmung: Adhärente Zellen mikroskopisch (schwarz) und trypsinierte Zellen mittels ViCell XR (rot).

Zahlen an der x-Achse repräsentieren den Mittelwert der jeweiligen Klasse; Durchführung in Sechs-Well Platten, die Trypsinierungszeit betrug 30 min; die Summe der Zellen in jedem Histogramm und für beide Methoden ergibt 100% per definitionem; mikroskopische Bestimmung nach Färbung der Zellen entsprechend Abschnitt 4.3.3;

Bei beiden Methoden der Bestimmung der Zellvolumina zeigte sich, dass bei 7 h eine enge Verteilung der Volumina mit kleinem durchschnittlichen Volumen (ViCell XR: 2500 µm^3; Mikroskop: 4100 µm^3) vorlag. Bei 30 h war die Verteilung für beide Methoden etwas breiter und das mittlere Volumen größer als bei 7 h (ViCell XR: 3000 µm^3; Mikroskop: 7200 µm^3). Zum Zeitpunkt 55 h nach Inokulation war das mittlere Volumen wieder etwas kleiner (ViCell XR: 2700 µm^3; Mikroskop: 2600 µm^3) und insbesondere die mikroskopisch bestimmten Volumina der adhärenten Zellen zeigten eine sehr schmale Verteilung. Deutliche Unterschiede sind für die beiden Methoden zu erkennen. So war das durchschnittliche Zellvolumen bei 30 h bei mikroskopischer Bestimmung doppelt so groß wie bei Bestimmung mittels ViCell XR. Der qualitative Verlauf der Zellvolumina war dennoch gleich und entsprach dem in Abbildung 5-12 (B) gezeigten Verhalten.

Für den weiteren Verlauf der Arbeit wurde zur Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen wie folgt verfahren. Zellen wurden mindestens 30 min trypsiniert, dann wurden mittels ViCell XR Zellzahl und Zelldurchmesser (der einzelne, nicht der mittlere) gemessen. Anschließend wurde aus den einzelnen Durchmessern der mittlere Durchmesser einer Messung berechnet. Durch Multiplikation des mittleren Durchmessers mit der Zellzahl der entsprechenden Probe wurde das Gesamtvolumen der Probe errechnet.

Dieses so bestimmte Gesamtvolumen schwankt aber um den wahren Wert der extrahierten Proben zu diesem Zeitpunkt, da sowohl die Zellzahlbestimmung und die Volumenbestimmung fehlerbehaftet sind als auch, weil durch die biologische Variabilität nicht die exakt gleiche Zellzahl und das gleiche Volumen sich in jedem Well befinden. Da der typische Verlauf des Volumens aber bekannt ist, wurde eine Näherung des Zellvolumens durchgeführt, indem eine sigmoide Funktion an die gemessenen Daten angepasst wurde. Die so ermittelten Volumina wurden anschließend für die Berechnungen der intrazellulären Konzentrationen verwendet, da angenommen wurde, dass diese Volumina den tatsächlichen Wert der extrahierten Proben besser widerspiegeln als die eigentlichen Messdaten. Um eine Redundanz zu vermeiden sei hier bereits auf Abbildung 5-18 verwiesen. Dort sind beispielhaft die sigmoiden Funktionen und die dazugehörenden Messdaten für zwei Kultivierungen dargestellt.

Bei Betrachtung der verschiedenen Möglichkeiten der Darstellung für die Metabolitbestimmung (Metabolitkonzentration pro Well; zellspezifische Metabolitmenge; intrazelluläre Konzentration) ist zu erkennen, dass die intrazelluläre Konzentration (im Well gemessene Metabolitmenge bezogen auf das Gesamtzellvolumen) die beste Reproduzierbarkeit lieferte, d. h. die Konzentrationen der Metaboliten bei verschiedenen Kultivierungen unter gleichen Bedingungen verhielten sich auch quantitativ ähnlich (Daten nicht gezeigt).

5.2.7 Diskussion der etablierten Probenvorbereitungsmethode

Wie sich in Vorversuchen zeigte, konnte keine in der Literatur beschriebene Methode zur Probenvorbereitung für die Bestimmung intrazellulärer Metaboliten direkt für die hier vorliegenden Versuchsbedingungen übernommen werden. Aus diesem Grund war die Auswahl, Adaption und Optimierung einer Methode zur Probenvorbereitung Voraussetzung für die Charakterisierung von tierischen Zellen anhand intrazellulärer Stoffwechselprodukte. Die zahlreichen Erkenntnisse aus Vorversuchen wurden als Grundlage für eine systematische Untersuchung der Probenvorbereitung genutzt und es wurde ein mehrstufiger Prozess zur Identifizierung einer optimalen Probenvorbereitung unter den gegebenen Bedingungen durchgeführt. Das iterative Vorgehen der Versuchsplanung und Auswertung erwies sich als äußerst sinnvoll, da so auf die erzielten Ergebnisse und die daraus gewonnenen Erkenntnisse reagiert werden konnte.

Grundsätzlich ist aber zu erwähnen, dass eine Messung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen mit Hilfe einer Probevorbereitung, also einer Extraktion von Metaboliten aus den Zellen, immer nur als Anhaltspunkt dienen kann. Ursache hierfür ist, dass der tatsächliche Einfluss der Probenvorbereitung nie vollständig überprüft werden kann. Zur Bestimmung der tatsächlichen intrazellulären Konzentrationen, also der wahren Werte, wäre ein nicht-invasives, absolut quantifizierendes Verfahren erforderlich.

5.2.7.1 Vergleich der Methoden aus der Literatur

Bei der Untersuchung von in der Literatur beschriebenen Extraktionsverfahren wurden verschiedenste beschriebene Methoden auf ihr Vermögen getestet, ATP zu extrahieren und Makromoleküle

abzureichern. Gründe für die Auswahl der Zielgrößen sind bereits oben genannt. Entscheidend war, dass die Messung dieser Zielgrößen grundsätzlich möglich war, keine Beeinflussung durch die Probenmatrix bestand und dass die Messungen schnell und einfach durchzuführen waren. Dadurch konnte der hohe Probenaufwand bewältigt werden. Beide Messverfahren erwiesen sich als geeignet, aber diese Zielgrößen bargen auch Nachteile.

Der Absorptionswert bei 280 nm ist zwar hauptsächlich durch die Verunreinigungen der Probe durch Protein und Nukleinsäuren bestimmt, allerdings absorbieren auch Nukleotide bei dieser Wellenlänge. Wenn somit der Wert *Absorption 280 nm* möglichst klein sein soll, ist die Konsequenz, dass auch Nukleotide nur in geringem Maß extrahiert werden. In Testmessungen zeigte sich allerdings, dass die *Absorption 280 nm* nur minimal durch Nukleotide beeinflusst war (Daten nicht gezeigt).

Die Zielgröße ATP, die hier noch genutzt wurde, ist nur eine von einer ganzen Reihe von Metaboliten, die von Interesse waren. ATP mag zwar repräsentativ für einige Nukleotide sein, allerdings ist fraglich, wie weit eine gute Extraktion von ATP mit der Extraktion von Zuckerphosphaten oder organischen Säuren korreliert. Da aber ein identisches Verfahren zur Quantifizierung aller Proben genutzt werden sollte, bot sich keine gute Alternative. Außerdem diente dieser Vergleich der verschiedenen Extraktionsmethoden nur als Vorauswahl für weitere Optimierungsschritte. Die Ergebnisse der drei unabhängigen Experimente erwiesen sich als aussagekräftig, so dass klare Unterschiede zwischen den Methoden identifiziert werden konnten. Grundsätzlich waren die meisten Methoden relativ gut geeignet, die beiden Ziele zu erreichen. Mit Ausnahme der Extraktion mit Ameisensäure waren für die Menge an extrahiertem ATP die Unterschiede zwischen den Methoden etwa ±25%. Dieses tendenziell positive Ergebnis war auch zu erwarten, da entsprechend den Referenzen diese Methoden für die Extraktion geeignet waren [31, 32, 176, 178, 211, 226, 236, 263]. Auch die Abreicherung der bei 280 nm absorbierenden Substanzen (z. B. Protein und Nukleinsäuren) war für die meisten Methoden gut, auch wenn dieser Parameter in keiner der genannten Referenzen untersucht wurde. Allerdings bedingt in den meisten Fällen eine gute Extraktion eine Abreicherung von Proteinen (Enzymen), um eine weitere Stoffwechselaktivität zu vermeiden. Aus diesem Grund sind viele der erwähnten Methoden indirekt auf diesen Parameter optimiert worden.

Somit konnte bei diesem Versuch gezeigt werden, dass die getesteten Methoden zum Großteil, entsprechend den angelegten Kriterien, geeignet sind, als Probenvorbereitung zu dienen. Dennoch wurden Unterschiede zwischen den Methoden gefunden. Allerdings sollen diese Versuche nicht die oben zitierte Literatur in Frage stellen, sondern vielmehr darauf aufmerksam machen, dass methodisch Feinheiten mitunter einen großen Einfluss auf das Ergebnis haben können. Besonders der untersuchte Organismus oder die Art der Probe ist hier sicher von großer Relevanz. Aufgrund der großen experimentellen Unterschiede zwischen der hier vorliegenden Arbeit und den entsprechenden Referenzen [31, 32, 176, 178, 211, 226, 236, 263] und auch, da dieser Versuch nur einen Zwischenschritt bei der Optimierung darstellte, sei hier auf einen weiterführenden Vergleich mit der Literatur verzichtet und auf Abschnitt 5.2.7.4 verwiesen.

5.2.7.2 Fraktioneller faktorieller Versuchsplan

Der Einsatz von statistischen Methoden zur Versuchsplanung ist in ingenieurwissenschaftlichen Disziplinen sehr populär, findet aber auch nach und nach Einzug in die Biowissenschaften [245-247, 249, 253]. Anwendungen im Bereich der Probenvorbereitung biologischer Proben sind allerdings eher selten. Zur Charakterisierung bzw. Optimierung einerseits der Extraktion von Pigmenten bzw. Fettsäuren und andererseits für die Derivatisierung von Metabolom-Proben vor einer GC-MS Analyse, wurden Methoden der statistischen Versuchsplanung eingesetzt. In allen drei Fällen erwies sich das Vorgehen anhand statistischer Methoden als effizienter Prozess und es konnten erfolgreich relevante Einflussgrößen identifiziert werden [277-279]. Andere Arbeiten gingen typischerweise mit einer Ein-Faktor-zu-einem-Zeitpunkt Strategie vor, wobei mitunter ein erheblicher experimenteller Aufwand bewältigt wurde [135, 138, 171, 176, 211, 236].

In der hier vorliegenden Arbeit sollte einerseits eine möglichst gute Charakterisierung der untersuchten Probenvorbereitungsmethoden erfolgen, andererseits sollte dies in einem überschaubaren zeitlichen Rahmen stattfinden, weshalb eine effiziente Vorgehensweise entsprechend statistischer Versuchsplanung gewählt wurde.

Nachdem in dem Vergleich der Methoden aus der Literatur eine erste Auswahl von grundsätzlich geeigneten Probenvorbereitungsmethoden erfolgt war, sollten die Effekte von zahlreichen Einflussgrößen auf die Extraktionsqualität überprüft werden. Nur durch den Ansatz entsprechend einem fraktionellen faktoriellen Versuchsplan konnten für die beiden Methoden fünf bzw. sechs Einflussgrößen mit zu rechtfertigendem Versuchsaufwand untersucht werden. Für ein anderes experimentelles Vorgehen hätte eine größere Anzahl von Einzelversuchen stattfinden müssen. Dies hätte bedeutet, dass der gesamte Versuch länger gedauert hätte und somit eine konstante Zellzahl über den Versuchszeitraum nicht gewährleistet hätte werden können.

Die fraktionellen faktoriellen Versuchspläne zur Untersuchung von potentiellen Einflussgrößen konnten einige offene Fragen bezüglich der Effekte auf die Probenvorbereitung klären. Ein Problem bei den Versuchen zur Untersuchung der beiden Methoden („MeOH/Kochen“ und „MeOH/$CHCl_3$“) war allerdings, dass die Modelle nur zum Teil signifikant waren. Auch waren nur einige Faktoren signifikant. Um die Aussagekraft dieser Modelle zu verbessern, hätte es verschiedene Möglichkeiten gegeben [245-248]. Für die gezeigten Experimente wurde kein Versuch unternommen, die Signifikanzen zu verbessern, sondern es wurde basierend auf den Ergebnissen über einige, Faktorniveaus entschieden. Von diesen Faktoren gingen in den untersuchten Bereichen nur geringe Effekte aus und da mit Ausnahme der *Temperatur MeOH* die Einflussgrößen kategorische Größen waren, wurde das bessere, wenn auch nicht signifikante bessere Niveau gewählt.

Der Vorteil der statistischen Versuchsplanung war, dass auch Einflussgrößen mit vermeintlich geringem Einfluss untersucht werden konnten, wie z. B. die Ultraschallbehandlung. Dadurch konnte entschieden werden, dass dieser Verfahrensschritt nicht notwendig ist. In der Literatur wurde eine Ultraschall-Behandlung mitunter eingesetzt, ohne den Einfluss tatsächlich zu überprüfen, so z. B.

für die Extraktion von Metaboliten aus Gewebe des Gehirns und anschließender Messung mittels NMR [263].

Da vergleichbare Versuche zur Untersuchung von Einflussgrößen auf die Probenvorbereitungsbedingungen für die Bestimmung von intrazellulären Metaboliten in der Literatur nicht gefunden werden konnten, kann an dieser Stelle kein Abgleich mit der Literatur erfolgen. Dieser experimentelle Abschnitt stellte aber auch nur eine Vorstufe zur endgültigen Auswahl einer Probenvorbereitung dar, weshalb erst die final genutzte Methode mit anderen Methoden aus der Literatur verglichen wird.

5.2.7.3 *Central Composite* Versuchsplan

Wie oben erwähnt, kann eine Konsequenz von nicht signifikanten Ergebnissen die Entscheidung für Folgeexperimente sein. Mit Hilfe eines *Central Composite* Versuchsplans sollten die Einflüsse von je drei kontinuierlichen Variablen geklärt werden. Da kein lineares Verhalten der Zielgrößen in Abhängigkeit von diesen Einflussgrößen zu erwarten war, wurden fünf Niveaus für jeden Faktor untersucht. Wie in Abschnitt 3.5.3 erwähnt, können die Ergebnisse eines *Central Composite* Versuchsplans häufig mit einem Polynom 2. Ordnung gut beschrieben werden. Aber insbesondere bei der Extraktionsmethode „MeOH/Kochen“ resultierte die Anpassung nicht in den erwarteten guten Signifikanzwerten. So wurde ein zweites Experiment geplant. Die Niveaus für die Faktoren wurden geringfügig verändert (s. Tabelle 4-4), um die Effekte auf die Zielgrößen besser erfassen zu können. Erst eine kombinierte Auswertung der Experimente 1 und 2 zeigte akzeptable Signifikanzwerte. Die Effekte des Puffers waren für beide Experimente gering. Auch in den vorangegangenen Experimenten waren nur relativ schwache Effekte ausgehend vom Puffer zu erkennen. Somit hat die Konzentration von Tricine scheinbar keinen erheblichen Einfluss auf die getesteten Zielgrößen. Deutliche Auswirkungen hatten die zwei weiteren Einflussgrößen auf die Zielgrößen. Trotzdem waren die Effekte nicht zwingend signifikant, was bedeutet, dass trotz der Bemühungen reproduzierbar zu arbeiten, Schwankungen durch nicht kontrollierte Faktoren auftraten. Insbesondere für den *F16bP-Gehalt* war die Anpassung vergleichsweise schlecht und die Variabilität groß. Der wichtigste Grund hierfür ist sicherlich die biologische Variabilität. Wie weiter unten erklärt (Abschnitt 5.3), ist besonders F16bP ein sensibler Metabolit, welcher schnelle Konzentrationsänderungen durchläuft. Die Experimente zur Optimierung der Methode erstreckten sich mitunter über mehrere Stunden, was tatsächlich vorhandene Unterschiede in den Metabolitkonzentrationen erklären kann (s. Abbildung 5-19). Auch andere als nicht relevant erachtete oder nicht bedachte Einflussgrößen (Zufallsgrößen) könnten Auslöser für eine erhöhte Variabilität gewesen sein. Da allerdings alle in Erwägung gezogenen Zufallsgrößen so gut wie möglich konstant gehalten wurden, können hier keine weiteren Variablen genannt werden, die für diese Erklärung in Frage kämen.

5.2.7.4 Vergleich der optimierten Methoden und abschließende Modifikationen

Der Vergleich der Methoden bezüglich der Wiederfindung ohne Zellen konnte klar zeigen, dass chemische und physikalische Verluste nur sehr gering ausfallen. Die geringfügig niedrigeren Werte

für die Methode „MeOH/Kochen“ könnten eventuell auf eine thermische Zersetzung einiger Metaboliten hindeuten. Eine alternative Erklärung wäre, dass die zweite Extraktion, die bei der Methode „MeOH/$CHCl_3$“ durchgeführt wurde, eine bessere Wiederfindung bewirkte. Beide Theorien wurden in früheren Versuchen untersucht (nicht gezeigt), konnten dort aber nicht bestätigt werden. Eine Erklärung für die niedrigere Wiederfindung für die größere Menge an zugegebenem Standard kann außer möglichen Fehlern beim Pipettieren nicht gegeben werden.

Die Unterschiede der zellspezifischen Metabolitmengen zwischen den beiden Methoden, wie sie in 5.2.3.2 beschrieben wurden, sind nur minimal. Dies kann für die beiden Methoden an tatsächlich auftretenden ungleichen Extraktionseffizienzen liegen. Zu berücksichtigen ist, dass die größte Schwankungsbreite bei Metaboliten mit niedrigen Konzentrationen auftrat. Eine mögliche Erklärung kann mit der Auswertung der Chromatogramme gegeben werden. Durch geringfügige Unterschiede in der Probenzusammensetzung können Abweichungen in der automatischen Peakintegration für die beiden Zelllinien oder Methoden aufgetreten sein, die sich bei kleinen Peaks besonders stark ausgewirkt haben. Grundsätzlich sind kleine Peaks immer stärker durch Schwankungen, welcher Art auch immer, beeinträchtigt als größere Peaks. Auch für diese Versuche könnte sicherlich die biologische Variabilität Ursache für Schwankungen gewesen sein. Nichts desto trotz waren die Übereinstimmungen der Metabolitmengen für alle Substanzklassen erstaunlich hoch für die zwei unterschiedlichen Methoden. Eine Erklärung könnte sein, dass zwei gute Methoden gewählt wurden, die präzise Ergebnisse liefern, welche dem wahren Wert relativ nahe liegen. Eine andere Erklärung ist sicherlich, dass beiden Probenvorbereitungsmethoden letztlich auf einem Metabolitextraktionsschritt mit gepuffertem MeOH beruhen. Somit hätten die beiden Methoden ähnliche Vorteile und Defizite bei der Solubilisierung der Metaboliten, was letztlich zu ähnlichen Ergebnissen führen würde.

Beim Vergleich der Wiederfindungen mit und ohne Zellen fällt auf, dass die Werte für die Proben mit Zellen einen erheblich größeren Schwankungsbereich aufwiesen. Dabei waren Nukleotide am meisten beeinflusst, da scheinbar während der Probenvorbereitung Nukleotidkinasen aktiv waren. Dass diese Nukleotidkinasereaktionen nicht bei der Optimierung entdeckt wurden, deutet auf ein klares Problem der Optimierungsprozedur hin. Da diese Reaktionen keine der gewählten Zielgrößen beeinflussten, war es nicht möglich, diese Umsetzungen bei der Optimierung zu detektieren. Somit drängt sich die Frage auf, ob die gewählten Zielgrößen die richtigen waren. Insbesondere zur *Energy Charge* wären Alternativen vorhanden gewesen, wie z. B. andere Metabolitverhältnisse (ATP/ADP; ATP/ADP × P_i). Aber auch diese Verhältnisse bergen gewisse Nachteile. So ist es sicher nicht möglich mit einem oder zwei Werten sämtliche chemischen und biologischen möglichen Umsetzungsprozesse aufzudecken. Da die *Energy Charge* sehr gut in der Literatur charakterisiert ist [8, 92-94, 115, 116, 235, 280, 281], war dieses Nukleotidverhältnis wahrscheinlich trotzdem eine gute Wahl. Grundsätzlich zeigte sich aber auch, dass es wichtig und erforderlich ist, dass man bei der Auswahl der Probenvorbereitung nicht nur anhand einer Variablen vorgehen sollte, sondern diverse, kritische Variablen berücksichtigt.

Ziel dieser Arbeit war nicht das Gleichgewichtsverhältnis der Nukleotidkinasereaktionen aufzuklären. Dennoch ist dieser Wert möglicherweise ein sinnvoller Richtwert für die Qualität der Extraktion. Literaturwerte hierfür unterscheiden sich jedoch merklich [222, 282-285]. Eine große Rolle bei der Bestimmung dieses Verhältnisses spielt, neben der Probenvorbereitung, der Organismus. Darüber hinaus weisen sicherlich auch verschiedene Kompartimente unterschiedliche Verhältnisse auf. Soboll et al. [222] zeigte, dass Adeninnukleotide im Cytosol der Leberzellen von Ratten im Gleichgewicht vorliegen und dass das Verhältnis ATP/ADP in Gewebe hauptsächlich durch den cytosolischen Wert bestimmt ist. Eine Schlussfolgerung der Arbeiten war, dass das Verhältnis der Adeninnukleotide für das gesamte Gewebe nahe dem Gleichgewicht liegen müsste. Hardie [285] bemerkte in seinem Review, dass eukaryontische Zellen eine sehr aktive Adenylatkinase besitzen, welche zu allen Zeiten die Adeninnukleotide im Gleichgewicht hält. Wichtige Einflussgrößen bei diesem Gleichgewicht sind zudem der pH-Wert und die Mg^{2+}-Konzentration, wobei dem Zweitgenannten bei der Translokation von ATP und ADP zwischen Cytosol und mitochondrialer Matrix eine wichtige Bedeutung zukommt. Für eine detaillierte Diskussion der Zusammenhänge der Nukleotidkinaseaktivitäten mit Nukleotidkonzentrationen und den relevanten Transportsystemen sei auf die Literatur verwiesen [282-284].

Die modifizierte Extraktionsmethode konnte gute Wiederfindungen erreichen, allerdings sollten diese Wiederfindungswerte nur als grober Richtwert angesehen werden. Grund hierfür ist, dass die Standards nicht dem intrazellulären Volumen zugegeben werden konnten. Somit wurden die zugegebenen Standards nicht dem eigentlichen Solubilisierungsprozess aus den Zellen unterzogen. Unter diesem Problem leiden aber alle Methoden, die eine Probenvorbereitung benötigen und intrazelluläre Metaboliten messen wollen. Dennoch kann das oben beschriebene Vorgehen zur Bestimmung der Wiederfindung Probleme und Schwachstellen der Extraktionsmethoden aufdecken, wie in Abschnitt 5.2.3 angedeutet. Ein Vergleich mit der Literatur zeigt, dass für die hier untersuchten Metaboliten auch in anderen Arbeiten ähnliche Werte für die Wiederfindung erzielt wurden. Nukleotide konnten z. B. mit 60 – 110% wiedergefunden, nachdem Standard zu Gewebe oder Zellpellets gegeben wurde und eine Extraktion folgte [32, 171, 177, 178, 225, 227, 236]. Allerdings wird nirgends von solch hohen Wiederfindungen für Nukleosiddiphosphate berichtet, wie sie in der hier vorliegenden Arbeit für die beiden unter 5.2.2.2 optimierten Methoden auftraten. Hierzu kann nur erwähnt werden, dass die exakte Durchführung, wie z. B. der Zeitpunkt der Zugabe des Standards, bei der Bestimmung der Wiederfindung von großer Bedeutung ist und zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Letztendlich konnte die Frage nicht geklärt werden, warum derart hohe Wiederfindungen für Nukleosiddiphosphate nicht in der Literatur berichtet sind.

Organische Säuren konnten von Lu et al. [33] mit Werten von 87 – 95% nach Extraktion mit PCS wiedergefunden werden. Haas et al. [243] erreichte nach einer Extraktion von organischen Säuren mit ACN aus Blut Wiederfindungen von 31 – 114% mit Ausnahme von Oxalacetat (14%). In der Literatur wird von Wiederfindungen zwischen 58 – 232% für verschiedene Zuckerphosphate nach Extraktion aus unterschiedlichen Proben berichtet [193, 240]. Durch das Abstoppen des Metabolismus mit heißer Luft und Extraktion mit heißem Wasser wurden von Hofmann et al. Wiederfindungen

von organischen Säuren und Zuckerphosphaten im Bereich von 20 – 190% für HepG2-Zellen erzielt [120]. Nach einer PCS Extraktion wurden Zuckerphosphate, Nukleotide und organische Säuren aus Lebergewebe mit Wiederfindungswerten von 90 – 105% gemessen [239]. Ein ähnliches Spektrum von Metaboliten untersuchte Vogt et al. [32]. Dabei wurden Wiederfindungen von 99% bei einer Extraktion aus Herzgewebe mit ACN erreicht. In einer groß angelegten Studie untersuchten Villas-Boas et al. unterschiedliche Extraktionsmethoden für Hefen [138]. Dabei wurden auch Wiederfindungen für verschiedene Metabolitklassen ermittelt. Beste Werte wurden für die Extraktion mit reinem MeOH erzielt, wobei allerdings Zuckerphosphate gänzlich nicht wiedergefunden wurden. Die einzige Methode, die eine Wiederfindung von Zuckerphosphaten ermöglichte, war die Extraktion mit MeOH/$CHCl_3$. Somit kann zusammenfassend bemerkt werden, dass es keine klaren Richtwerte für die Wiederfindungen von Metaboliten oder Metabolitklassen gibt. Sehr unterschiedliche Werte werden in der Literatur angegeben, was sowohl auf eine fehlende einheitliche Methodik der Bestimmung der Wiederfindung als auch auf unterschiedliche Arten von Proben zurückzuführen ist.

Neben der Wiederfindung sind die absoluten Mengen oder Konzentrationen der extrahierten Metaboliten ein Kriterium für die Qualität der Extraktion. Der Vergleich mit der Literatur wird hier allerdings auf die Werte für kultivierte tierische Zellen beschränkt, da aus biologischen Gründen große Unterschiede zu den Werten für Gewebe, Hefen oder Prokaryonten zu erwarten sind. Allerdings birgt auch der Vergleich mit anderen kultivierten Zellen Probleme, da aufgrund von unterschiedlichen Zelllinien, Kultivierungsbedingungen, Medienzusammensetzungen und physiologischen Zuständen die gemessenen Konzentrationen einen weiten Bereich abdecken können. Schon die in der hier vorliegenden Arbeit gezeigten Konzentrationen für MDCK- und Vero-Zellen deuten klare Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien an. Zusätzlich war im weiteren Verlauf der hier vorliegenden Arbeit eine klare Abhängigkeit der zellspezifischen Metabolitmengen vom Kultivierungszustand bzw. dem Zeitpunkt der Probenahme während einer *Batch*-Kultivierung festgestellt worden. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle von einem detaillierten Vergleich mit Literaturwerten abgesehen und auf die Diskussion im Abschnitt 5.3.5 verwiesen. Dort werden minimale und maximale zellspezifische Metabolitmengen für typische *Batch*-Kultivierungen von MDCK- und Vero-Zellen angegeben.

Grundsätzlich zeigte sich aber bereits anhand der bei den Extraktionsversuchen gemessenen Werten, dass mit der Literatur vergleichbare Metabolitmengen für kultivierte tierische Zellen bestimmt wurden.

Der große Vorteil der hier durchgeführten Arbeiten zur Etablierung einer Probenvorbereitung ist sicherlich, dass nicht nur Methoden verglichen wurden, sondern dass auch eine systematische Charakterisierung bzw. Optimierung und zwar, anhand von vier Zielgrößen, stattfand. Häufig wurden in der Vergangenheit bei der Auswahl von Probenvorbereitungsmethoden nur verschiedene alternative Verfahren verglichen [135, 138, 173, 176, 217, 226, 230, 263]. Da die genauen experimentellen Umstände einen großen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit einer Probenvorbereitungsmethode haben können, sollte eine Anpassung an exakt die vorliegenden Bedingungen nicht ausbleiben,

wenn quantitative Daten erhoben werden sollen. Gerade das gezeigte Phänomen der Nukleotidkinaseaktivität (s. 5.2.4) während der Extraktionen deutet an, welche Gefahren bei der Übertragung von Methoden existieren.

5.2.7.5 Bestimmung der Varianz der vollständigen Methode

Die Präzision der Messung wurde anhand der mehrfachbestimmten Extraktionsproben abgeschätzt. Diese Untersuchung in Kapitel 5.2.5 zeigte eine durchschnittliche relative Standardabweichung von 11,5%. Dieser Wert lag deutlich über der in Abschnitt 5.1.1.5 ermittelten mittleren relativen Standardabweichung von 5,9%, welche bei Bestimmung anhand der Messung der Standardverdünnungen ermittelt wurde. Nicht nur im Mittel, sondern auch für die einzelnen Metaboliten war die relative Standardabweichung bei Bestimmung anhand von Extraktionsproben höher (vgl. Tabellen A6 und A9 im Anhang). Prinzipiell erscheint dies sinnvoll, da die Standardmessungen Wiederholungsmessungen waren und die Mehrfachbestimmungen der Proben die Variabilität durch individuelle Probenvorbereitung und die biologische Variabilität (unterschiedliche Wells) zusätzlich berücksichtigten. Gerade dieser Punkt ist entscheidend für eine realistische Abschätzung der Präzision einer kompletten Methode [266-268]. Somit enthielten die Standardabweichungen aus Abschnitt 5.1.1.5 nur die gerätebedingte Variabilität. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die Standards nicht den identischen Konzentrationsbereich abdeckten wie die gemessenen Proben. Dies bedeutet, dass unterschiedliche Konzentrationsbereiche auf ihre Variabilität untersucht wurden. Da aber die relative Standardabweichung in den niedrigeren Konzentrationsbereichen höher war, ist ein aussagekräftiger Vergleich zwischen den beiden unterschiedlich ermittelten Standardabweichungen schwierig. Eine Abschätzung der Unterschiede zwischen den beiden Verfahren unter 5.1.1.5 (basierend auf Standards) und 5.2.5 (basierend auf Extraktionsproben) kann mithilfe der aus der Regression ermittelten Schätzwerte erfolgen, da dadurch gleiche Konzentrationswerte verglichen werden können. Entgegen den Erwartungen zeigte sich, dass allerdings nicht grundsätzlich ein höherer Wert für die mit Extraktionsproben ermittelte Standardabweichung (s. 5.2.5) vorzufinden war, als für die Werte der Bestimmung mit Standardmessungen (s. 5.1.1.5). Als möglicher Grund kann hier das Vorgehen zur Schätzung der Standardabweichung angegeben werden. Das heißt, die einfache lineare Regression könnte aus verschiedenen Gründen fehlerbehaftet sein. Eine Diskussion der Schätzung der Varianz basierend auf einer Regression und alternativer Verfahren zur linearen Regression ist von Thompson bzw. Stanley gegeben [266, 267]. Außerdem wurde für die Extraktionsproben ein engerer Konzentrationsbereich (niedrige Konzentrationen) untersucht, weshalb in diesem Bereich die Regression besser war.

Unabhängig von diesen Aspekten kann angenommen werden, dass eine realistische Schätzung der Standardabweichungen für die verschiedenen Metaboliten für Extraktionsproben von in Sechs-Well Platten kultivierten adhärenten Zellen mit der in 5.2.5 ermittelten Gleichung erreicht wurde (s. Tabelle A 12 im Anhang). Die gerätespezifische Variabilität, welche auch die Schwankungen von Tag zu Tag und von langen Messsequenzen (bis zehn Tage) berücksichtigt, kann gut mit der unter

5.1.1.5 ermittelten Gleichung geschätzt werden (s. Tabelle A 9 im Anhang). Diese Präzision dürfte bei der Beurteilung der Qualität von Messungen von z. B. Suspensionszellen als Anhaltspunkt dienen, bevor eine intensivere Untersuchung der Varianz für die spezielle Probenvorbereitung erfolgen kann. Weiterhin könnte basierend auf dieser Schätzung der Standardabweichung eine gewichtete Kalibration eingeführt werden.

Verglichen mit den gängigen Verfahren zur Bestimmung der Präzision im Bereich des *Metabolic Profiling* stellt dieses Verfahren wahrscheinlich eine Verbesserung der Einschätzung der tatsächlichen Messgenauigkeit dar. Typische Verfahren basieren auf einer Validierung im oben beschriebenen Sinne (s. Abschnitt 5.1.1.2), wobei unter relativ artifiziellen Bedingungen eine Kalibrierung bzw. Wiederholungsmessungen durchgeführt wurden [33, 177, 183, 195, 196, 286]. Dies bedeutet, dass häufig eine Messung der Validierungsproben direkt hintereinander stattfindet, wodurch die Schwankungen naturgemäß vergleichsweise klein sind. Gerade im Falle einer Messung mit einem ESI-MS-Detektor treten im Laufe von längeren Messsequenzen typischerweise Schwankungen des Messsignals durch gerätebedingte instabile Parameter oder Verschmutzung verschiedener Bauteile des MS-Detektors durch Probenablagerungen auf [270]. Das wahrscheinlich häufig auftretende Phänomen einer nicht homogenen Varianz über den Messbereich wird selten kommentiert. Dennoch wurde von z. B. Luo et al. [195] eine Gewichtung *1/Konzentration* verwendet.

Basierend auf Erfahrungswerten wird angenommen, dass die in der hier vorliegenden Arbeit ermittelten Standardabweichungen eine realistische Abschätzung des tatsächlichen Fehlers für die vollständige Methode inklusive der Probenvorbereitung darstellt.

5.2.7.6 Abschätzung des Zellvolumens

Für einen Vergleich der Daten aus verschiedenen Experimenten bzw. für unterschiedliche Probennahmezeitpunkte, aber auch für einen Vergleich mit der Literatur ist es sinnvoll von einer Angabe der Metabolitmengen in Werten pro Well (einer Sechs-Well Platte) abzurücken.

Wie bereits oben beschrieben (Abschnitt 5.2.6) ist der Bezug der gemessenen Metabolitkonzentration auf entweder die Zellzahl oder das Zellvolumen wichtig, wenn eine Änderung der Zellzahl oder des Volumens während eines Versuches stattfindet. Für Versuche, die innerhalb eines kurzen Zeitraums erfolgten (< 6 h), wurde in den Versuchen aus Kapitel 5.2 ausgegangen, dass keine signifikante Zellzahländerung stattfindet. Da diese Versuche am Ende der exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt wurden, mag diese Annahme akzeptabel sein, da zu diesem Zeitpunkt bereits ein verlangsamtes Wachstum auftrat. Für weitere Versuche wurde aber der Zeitraum, in dem eine konstante Zellzahl angenommen wurde, auf < 3 h verkürzt, um sicher zu gehen, dass diesbezüglich keine Fehler unterlaufen. Für längere Kultivierungen wurden die ermittelten Metabolitkonzentrationen pro Well wie oben beschrieben durch das Gesamtzellvolumen pro Well subtrahiert, um Metabolitkonzentrationen zu erhalten. Allerdings wurden bei dem beschriebenen Verfahren zur Ermittlung des Gesamtzellvolumens einige Annahmen getroffen. Die Zellzahl wurde durch Trypsinierung der Zellen und anschließender Zählung mithilfe des Gerätes ViCell XR bestimmt. Insbesondere bei der Trypsinierung stellt sich die ob alle Zellen abgelöst wurden. Hier

scheint das Alter der Kultur, das Medium und vor allem die Zelllinie eine große Rolle zu spielen. Eine weitere Diskussion zur Zellzahlbestimmung und der Abschätzung des Zellzahlverlaufs in Sechs-Well Platten ist unter Punkt 5.3.2.2 gegeben. Als erheblich problematischer als die Zellzahlbestimmung stellte sich die Zellvolumenbestimmung heraus. Der Effekt der Volumenänderung nach Beginn der Trypsinierung (s. Abbildung 5-12 A) wurde vereinheitlicht, indem eine minimale Wartezeit von 30 min nach Beginn der Trypsinierung eingeführt wurde. Allerdings konnte die Frage nicht geklärt werden, welches Volumen dem tatsächlichen Volumen im adhärenten Zustand entspricht. Für den Fall, dass das maximal erreichte Volumen (ca. 10 min nach Beginn der Trypsinierung; s. Abbildung 5-12 A) dem tatsächlichen Volumen entspricht, würde ein erheblicher, systematischer Fehler auftreten. Um dies aufzuklären, wurde die oben erwähnte Mikroskopie der adhärenten Zellen durchgeführt. Eine routinemäßige mikroskopische Bestimmung der Zellvolumina wäre aufgrund des großen Aufwandes zwar nicht möglich, aber idealerweise sollte ein Abgleich zwischen den mikroskopisch und den mittels ViCell XR ermittelten Volumina erfolgen. Im Falle einer konstanten Über- oder Unterschätzung der einen Methode hätte eine Anpassung durch einen empirischen Faktor stattfinden können. Allerdings hätte auch auf diese Weise keine Bestimmung des wahren Zellvolumens erfolgen können, da nicht nur die Methoden mittels des ViCell XR, sondern auch die mikroskopische Methode fehlerbehaftet ist. Auch mikroskopisch war kein eindeutiges Ergebnis zu ermitteln, da kein Abgleich bzw. keine Kontrolle der Ergebnisse möglich war. Dies bedeutet, dass das auf diese Weise ermittelte Volumen durch die Art der Zellfärbung und besonders durch die Vermessung der Zellen, die der Subjektivität des Experimentators unterliegt, beeinflusst war. Im Grunde zeichneten sich zwar gleiche Tendenzen bei den beiden Verfahren zur Volumenbestimmung ab, aber auch deutliche Unterschiede, sowohl in der Verteilung als auch in den absoluten Werten, waren vorhanden. Ein Problem beim Abgleich der Daten könnte dadurch aufgetreten sein, dass in der Software des ViCell XR ein Zelltyp für die Auswertung benutzt wurde, der einen maximalen Zelldurchmesser von 25 µm zuließ, was in vorangegangenen Experimenten (nicht gezeigt) als ausreichend definiert wurde. Es zeigte sich aber in späteren Versuchen, dass typischerweise gerade im frühen Stadium einer Kultivierung (zwischen 8 und 40 h) auch deutlich größere Zellen in Kulturen existieren. Auch mikroskopisch war dies nachzuweisen. Bei Berücksichtigung dieser großen Zellen wäre das durchschnittliche Zellvolumen insbesondere bei t = 30 h größer ausgefallen. Allerdings kann durch diesen Fehler keine vollständige Erklärung der Unterschiede zwischen mikroskopischen und mittels ViCell XR ermittelten Werten erfolgen. Die Abschätzung der Fläche bei mikroskopischer Vermessung war sicherlich relativ gut. Allerdings traten bei der Vermessung der Höhe der Zellen Probleme auf. So konnte nicht geklärt werden, wie weit eine Überschätzung des Volumens aufgrund eines Durchscheinens der Färbung in der Z-Ebene stattgefunden hat. Da der Rahmen dieser Arbeit eine genauere Untersuchung der Zellvolumina nicht zuließ und keine Hinweise vorlagen, dass das mikroskopisch bestimmte Volumen einen realistischeren Wert widerspiegelt, wurde aus Gründen der Durchführbarkeit das Zellvolumen mittels Trypsinierung und Bestimmung durch das Gerät ViCell XR ermittelt. Die Abschätzung des

tatsächlichen Volumenverlaufs durch die Anpassung eines sigmoiden Kurvenverlaufs wird in Abschnitt 5.3.2.2 diskutiert.

Als Bezugsgröße für intrazelluläre Metabolitdaten wird in der Literatur häufig die Zellzahl verwendet [25, 95, 96, 115, 117, 120, 177, 186, 219, 235, 281]. Wie bereits oben beschrieben stellt hier aber eine Veränderung der Zellgröße ein Problem dar. In einigen Fällen kann wahrscheinlich angenommen werden, dass keine Änderung des durchschnittlichen Zellvolumens auftritt. Allerdings ist gerade bei Kultivierungen im *Batch*-Verfahren aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsphasen eine Veränderung des Zellvolumens zu erwarten. Dies ist damit zu begründen, dass Zellen in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus eine unterschiedliche Größenverteilung besitzen. So ist die S-Phase typischer Weise mit einem größeren Volumen verbunden als in den verbleibenden Phasen. Dies bedeutet, dass schnell teilende Zellen, auch ein höheres durchschnittliches Zellvolumen aufweisen [287-289]. Somit fände bei Bezug auf die Zellzahl eine Überlagerung der Konzentrationsänderungen mit den Volumenänderungen statt. Trotz dieses Problems ist die Zellzahl normalerweise die erste Wahl als Bezugsgröße, insbesondere bei Suspensionszellen, da die Zellzahl meist den wichtigsten zu bestimmenden Parameter darstellt und deshalb nahezu immer ermittelt wird.

Zwei weitere Möglichkeiten, die häufig bei der Bestimmung von Metabolitmengen in Geweben eingesetzt wurden, sind der Bezug auf Zellprotein [29, 175, 181, 216, 218, 224] oder auf Frischgewicht der Zellen oder des Gewebes [89, 222, 225, 237, 263, 290].

Grundsätzlich empfiehlt sich aber das Zellvolumen als sinnvolle Bezugsgröße. Grund hierfür ist, dass bei der Bestimmung von intrazellulären, frei suspendierten Metaboliten das Interesse in den Konzentrationen dieser Stoffwechselprodukte liegt, da die Konzentrationen ein entscheidender Faktor im Bezug auf enzymatische Reaktionsgeschwindigkeiten sind. Als Einschränkung ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Berechnung des Zellvolumens basierend auf den äußeren Strukturen der Zellen nur eine grobe Näherung darstellt. Des Weiteren liegen in Eukaryonten keine homogenen Konzentrationen vor, was mit der Kompartimentierung der Zellen zu begründen ist.

In der Literatur erfolgte die Bestimmung des Volumens von Zellen z. B. nach dem Coulter-Prinzip [287-289, 291] oder mikroskopisch [171, 188, 281, 292, 293]. Für MDCK-Zellen wurde das Zellvolumen in einem Bereich von 500 – 10700 μm^3 bestimmt [292-294]. Von Rothen-Rutishauser et al. [293] wurde zu Beginn der Kultivierung (1 Tag nach Einsaat) das größte Zellvolumen nachgewiesen. Mit weiterer Kultivierungszeit nahm das Zellvolumen ab. In ähnlicher Form konnten Erlinger und Saier eine negative Korrelation zwischen dem zellulären Volumen und der Zellzahl/Fläche zeigen [294]. Dies entspricht den Beobachtungen der hier vorliegenden Arbeit.

Grundsätzlich zeigten aber die verschiedenen Arbeiten, dass je nach Bestimmungsmethode mit deutlichen Unterschieden beim ermittelten Volumen zu rechnen ist. Da in der hier vorliegenden Arbeit ganz deutliche Volumenänderungen der Zellen durchlaufen wurden, erschien das Gesamtvolumen als sinnvollste Bezugsgröße.

Abschließend ist zu bemerken, dass sich diese hier etablierte Methode zur Konzentrationsmessung intrazellulärer Stoffwechselprodukte als robust und gut reproduzierbar erwies und darüber hinaus

sehr gut charakterisiert werden konnte, allerdings traten im weiteren Verlauf der hier vorliegenden Arbeit gelegentlich nicht zu erklärende Schwankungen der Messwerte vermeintlich gleicher Proben auf. Dies zeigte sich unter anderem in den Konzentrationsverläufen der folgenden Abschnitte dieser Arbeit. Als genereller Grund für diese Schwankungen wird vor allem eine zufällige biologische und experimentelle Variabilität verantwortlich gemacht. Dies bedeutet z. B., dass normalerweise ein nahezu identisches Wachstumsverhalten von Zellen in Sechs-Well Platten vorgefunden wurde, dennoch gab es auch Ausnahmen, wobei kein vollständiger Bewuchs von Wells auftrat. Diverse experimentelle, aber auch materialtechnische Probleme können hierfür ein Grund gewesen sein. So wurde z. B. ein in der hier durchgeführten Arbeit aufgetretenes Wachstumsproblem vom Hersteller als Fertigungsfehler der entsprechenden Sechs-Well Platten Charge bestätigt. Auch die oben erwähnte Abschätzung des Zellvolumens ist mitunter fehlerbehaftet und gerade niedrige Zellzahlen pro Well zu Beginn einer Kultivierung können leicht zu einem fehlerhaften Gesamtzellvolumen führen. Dies wiederum resultiert in fehlerhaften Konzentrationsberechnungen. Da diese hier genannten Gründe für Schwankungen der Konzentrationen für alle Versuche in gleicher Form aufgetreten sein können, wird in den folgenden Abschnitten auf eine explizite Erwähnung dieser Erklärungen für die auftretende Variabilität verzichtet.

5.2.8 Zusammenfassung zur Optimierung einer Probenvorbereitungsmethode

In dieser Arbeit wurde eine Probenvorbereitung zur Bestimmung von intrazellulären Stoffwechselprodukten des Zentralstoffwechsels für adhärente Zelllinien entwickelt, welche eine anschließende Quantifizierung der Metaboliten durch AAC erlaubt. Nach einem generellen Vergleich von verschiedenen gängigen Probenvorbereitungsmethoden basierend auf ihrer Eignung zur Extraktion von ATP (Lumineszenzmessung) und der Abreicherung von Protein und Nukleinsäuren (*Absorption bei 280 nm*), wurden zwei Methoden in unabhängigen Verfahren mit Hilfe von statistischer Versuchsplanung optimiert. Hierfür wurden vier Zielgrößen verwendet: *Energy Charge*, *Nukleotidgehalt*, *Fructose-1,6-Bisphosphat-Gehalt* und die *Absorption 280 nm*. Die Bestimmung der Metabolitkonzentrationen erfolgte anhand der unter Kapitel 5.1 entwickelten Chromatographiemethode. In einem Screening der Einflussgrößen basierend auf einem fraktionellen faktoriellen Versuchsplan konnten relevante Faktoren für die beiden Methoden identifiziert werden. Zur Optimierung wurden die vier Zielgrößen mittels *Desirability*-Funktionen vereint, wodurch auf objektive Weise ein Gesamtoptimum für jede der Methoden gefunden werden konnte. Im folgenden Versuch wurde anhand eines *Central Composite* Versuchsplans eine genaue Charakterisierung der beiden Methoden in Abhängigkeit von drei kontinuierlichen Einflussgrößen durchgeführt. Auch für diese Versuche wurde eine Optimierung durch Nutzung von *Desirability*-Funktionen durchgeführt.

Die beiden auf diese Weise unabhängig voneinander entwickelten Methoden wurden in der Folge verglichen. Hierzu wurden die Methoden auf ihr Potential getestet, intrazelluläre Metaboliten quantitativ zu extrahieren und nach Standardzugabe eine Wiederfindung von 100% zu erzielen. In diesen Versuchen wurde eine Enzymaktivität entdeckt, die während der Probenvorbereitung eine Umsetzung von Nukleotiden bewirkte. Aus diesem Grund wurde eine Methode entwickelt, welche

auf einzelnen Schritten der zuvor optimierten Methoden basierte. Diese Methode war in der Lage, sämtliche Enzymaktivitäten zu unterbinden und somit mit der Literatur vergleichbare absolute Metabolitkonzentrationen zu erzielen. Die Wiederfindungen dieser Methode waren für fast alle untersuchten Metaboliten zwischen 90 und 110%. Somit konnte eine verlässliche und robuste Methode zur Probenvorbereitung für die gleichzeitige Bestimmung von 30 verschiedenen intrazellulären Metaboliten aus dem Zentralstoffwechsel etabliert werden.

Einer der Vorteile dieser Probenvorbereitung liegt in der generellen Anwendbarkeit. So können die auf diese Weise erzeugten Proben mit unterschiedlichsten analytischen Methoden zur Quantifizierung wie z. B. AAC oder Gaschromatographie, analysiert werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass durch die systematische Optimierung anhand mehrerer Zielgrößen unterschiedlichste Metabolitklassen erfolgreich mit dieser Methode extrahiert werden können. Aus diesem Grunde ist zu erwarten, dass diese Methode auch für Analysen im Forschungsbereich *Metabolomics* erfolgreich anzuwenden ist. Ein weiterer, zu erwähnender Pluspunkt ist, dass diese Methode ausführlich charakterisiert wurde und für jeden zu bestimmenden Metaboliten eine realistische Schätzung der Standardabweichung existiert. Laufende Arbeiten deuten an, dass eine erfolgreiche Nutzung dieser Methode in leicht modifizierter Form sowohl für Suspensionszelllinien als auch Bakterien möglich ist.

5.3 Untersuchung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen tierischer Zellen

Neben der Etablierung der Methode zur Bestimmung von intrazellulären Stoffwechselprodukten, war das Ziel der hier vorliegenden Arbeit, intrazelluläre Konzentrationen in kultivierten tierischen Zellen und deren Verläufe zu ermitteln. Aus diesem Grund wurden zahlreiche Kultivierungsversuche unter diversen Bedingungen und über verschiedene Zeiträume durchgeführt und hierfür die intrazellulären Konzentrationen ermittelt. Es wurden zwei adhärente Zelllinien (MDCK und Vero) und mehrere Medien untersucht. Diese Versuche erstreckten sich typischerweise über vier bis zu acht Tage. Zusätzlich wurden Kurzzeitexperimente mit MDCK-Zellen durchgeführt, in welchen die Metabolitkonzentrationen in kurzen Zeiträumen nach veränderten Bedingungen (z. B. Medienaustausch) bestimmt wurden. Während in den Kultivierungsexperimenten grundsätzlich die physiologischen Metabolitkonzentrationen unter typischen Kultivierungsbedingungen ermittelt werden sollten, war das Ziel der Kurzzeitexperimente, die Geschwindigkeit der Änderungen der Metabolitpools aufzuklären. Im möglichen Rahmen dieser Arbeit werden hier wesentliche Ergebnisse dieser Experimente beschrieben und diskutiert.

Da dieser Abschnitt einer besonders ausführlichen Diskussion bedurfte, die Ausführungen für den Leser bestmöglich nachzuvollziehen sein sollten, aber Redundanzen bei der Beschreibung der Versuche vermieden werden sollten, wurde in diesem Teil der Arbeit die Diskussion direkt bei den einzelnen Unterpunkten mit eingearbeitet.

5.3.1 Generelles Korrelationsverhalten von intrazellulären Metabolitkonzentrationen

Zur Klärung der Frage, welche Stoffwechselprodukte sich in ihren Mengen grundsätzlich, also unter verschiedensten Bedingungen (unterschiedliche Zellen, Medien, Kultivierungsbedingungen), gleich verhalten bzw. ob offensichtliche Beziehungen zwischen Metaboliten existieren, wurden die Ergebnisse aus verschiedenen Experimenten gemeinsam ausgewertet. Das heißt, die Metabolitkonzentrationen von ca. 1500 einzelnen, mit Zellen bewachsenen Wells (aus Sechs-Well-Platten) wurden in Streudiagrammen aufgetragen. Gegenseitige Abhängigkeiten von je zwei Metaboliten sollten so aufgedeckt werden. Exemplarisch sind zwei dieser Diagramme in Abbildung 5-14 dargestellt. Während Citrat und *cis*-Aconitat ein sehr ähnliches Verhalten zeigten (Korrelationskoeffizient $r = 0{,}97$), erwiesen sich Pyruvat und F16bP als unkorreliert ($r = -0{,}05$). Insbesondere im Streudiagramm für Pyruvat und F16bP scheinen zwei Populationen zu erkennen zu sein. Ursache hierfür waren unterschiedliche Bedingungen in den Versuchen, die dem Diagramm zu Grunde liegen.

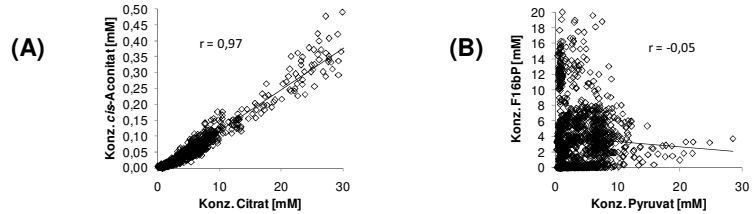


Abbildung 5-14: Streudiagramme für die jeweils gleichzeitig gemessenen Konzentrationen von (A): Citrat und cis-Aconitat und (B): Pyruvat und F16bP.

Aufgetragen sind die Konzentrationen pro Well für die jeweiligen Metaboliten für sämtliche Messungen, die nach der Etablierung der Probenvorbereitungsmethode durchgeführt wurden; die Geraden stellen eine lineare Regression dar; r entspricht den jeweiligen Korrelationskoeffizienten.

Die Zusammenhänge zwischen den Metaboliten sind in diesen Diagrammen gut zu erkennen. Da aber mehr als 30 Variablen hier untersucht werden sollten, war weder eine geeignete Darstellung, noch war eine detaillierte Analyse der Diagramme möglich. Aus diesem Grund wurde eine Auswertung ohne Darstellung in Diagrammform durchgeführt. Diese wird im weiteren Verlauf als Korrelationsanalyse bezeichnet.

Hierfür wurden die einzelnen Variablen miteinander korreliert und auf diese Weise für jede Kombination zweier Variablen der Korrelationskoeffizient *r* errechnet (s. a. Abschnitt 3.6). Dies entspricht einer Kreuzkorrelation ohne Zeitverschiebung zwischen den beiden korrelierten Variablen. Abbildung 5-15 stellt das Ergebnis in Form einer Korrelationsmatrix dar, wobei der Grad der Färbung (blau: positiv; rot: negativ) die Stärke der Korrelation andeutet. Die in den Feldern aufgeführte Zahl repräsentiert den *p*-Wert der entsprechenden Korrelation. Die Metaboliten in Abbildung 5-15 wurden nach Stoffwechselwegen gruppiert. So bilden die Stoffwechselprodukte aus der Glykolyse einen Block, eine weitere Gruppe bilden die Metaboliten aus dem Krebszyklus und wiederum einen weiteren Block repräsentieren Nukleotide.

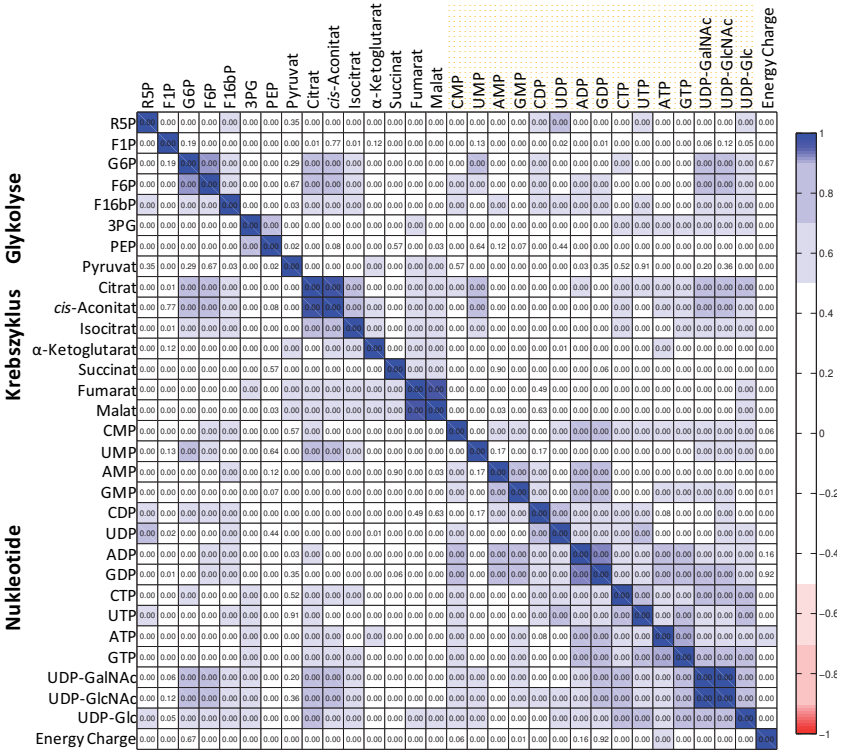


Abbildung 5-15: Korrelationsmatrix für die Konzentrationen intrazellulärer Metaboliten und der Energy Charge basierend auf den Einzelmessungen aller Experimente.

Sowohl auf x- als auch y-Achse sind die unterschiedlichen Metaboliten aufgetragen. Grundlage der Korrelationsanalyse waren ca. 1500 Einzelmessungen mit MDCK- und Vero-Zellen unter unterschiedlichsten Kultivierungsbedingungen, durchgeführt mit der in dieser Arbeit etablierten Methode; Felder mit positiven Korrelationskoeffizienten $r > 0{,}5$ sind blau gefärbt, negative entsprechend rot; ab einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0{,}7$ (bzw. -0,7) ist eine stärkere Sättigung der Farben verwendet; zur besseren Veranschaulichung von sehr starken Korrelationen ist zusätzlich bei Werten $r > 0{,}9$ (bzw. $< -0{,}9$) ein Farbgradient bis hin zur vollständigen Sättigung genutzt. Der p-Wert der jeweiligen Korrelation ist als Zahl in den einzelnen Feldern gegeben.

Grundsätzlich zeigte sich an den überwiegend blau gefärbten Feldern, dass die meisten Metaboliten positiv miteinander korreliert waren. Allerdings hat die Mehrheit hiervon einen Korrelationskoeffizienten $r < 0{,}8$ was somit eine nur moderate Korrelation andeutet. Folgende Metabolitgruppen waren jedoch sehr stark korreliert (Korrelationskoeffizient $r > 0{,}9$): G6P und F6P; Citrat und *cis*-Aconitat; Malat und Fumarat; ADP und GDP, ATP und GTP; UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc. Diese Metabolitpaare verhielten sich somit in sämtlichen für diese Auswertung genutzten Versuchen sehr ähnlich. Negative Korrelationen waren nicht zu finden. Wie sich an den zum Großteil niedrigen *p*-Werten ($< 0{,}01$) zeigte, waren viele der Korrelationen signifikant.

Diskussion

Um generelle Zusammenhänge zwischen den Konzentrationen verschiedener Metaboliten aufzuklären, fand eine gemeinsame Auswertung aller Versuche, welche mit der etablierten Probenvorbereitung durchgeführt wurden, statt. Die Darstellung anhand der beiden Streudiagramme aus Abbildung 5-14 verdeutlicht die möglichen Zusammenhänge zwischen den Konzentrationen verschiedener Metaboliten. Für beide Fälle scheint die lineare Abschätzung der Korrelation valide zu sein. Allerdings scheinen sich in Abbildung 5-14 (B) zwei Populationen anzudeuten. Bei zahlreichen Streudiagrammen für andere Metaboliten traten ähnliche Gruppierungen mehrerer Messwerte auf. Auch eindeutig nicht lineare Zusammenhänge waren zu finden. Dies war allerdings nur mithilfe von Streudiagrammen zu erkennen, da die Berechnung des Korrelationskoeffizienten solche Phänomene nicht berücksichtigt. Der Grund für die inhomogenen Populationen lag sicherlich in den unterschiedlichen, bei dieser Auswertung zusammengefassten Experimenten. So ist leicht verständlich, dass für Vero-Zellen (s. 5.3.3) andere Verhältnisse der Metaboliten vorlagen als für MDCK-Zellen (s. 5.3.2). Ebenso ist einfach nachzuvollziehen, dass nach dem schlagartigen Entfernen von Medium (s. 5.3.4.1) stark veränderte Bedingungen auftraten, verglichen mit einer typischen *Batch*-Kultivierung (s. 5.3.2). Bei der Berechnung der Korrelationskoeffizienten ist die genannte Inhomogenität der Populationen (s. Abbildung 5-14) grundsätzlich irrelevant, kann aber zu einer Fehlinterpretation des Korrelationskoeffizienten führen. Eine korrekte statistische Prüfung auf Signifikanz setzt jedoch eine Normalverteilung voraus. Da dies nicht für alle Kombinationen gegeben war, sind die angegebenen *p*-Werte nur nach Überprüfung durch ein Streudiagramm gänzlich zu akzeptieren.

Ein Überblick über die Korrelationen zwischen den einzelnen Metabolitkonzentrationen, die unter unterschiedlichen Bedingungen gemessen wurden, ist in Abbildung 5-15 gezeigt. Auffällig ist hierbei, dass entweder keine Korrelationen oder positive Korrelationen vorlagen. Entscheidender Grund hierfür war sicherlich, dass in dem hier verwerteten Datensatz eine ganze Reihe von Kultivierungsexperimenten zusammengefasst wurde. Da hierbei aber die Metabolitkonzentration pro Well genutzt wurde (nicht pro Zelle), war logischerweise mit dem Wachstum ein Anstieg der Konzentration pro Well zu verzeichnen. Somit überlagerten sich hier der Effekt der Änderung der Metabolitkonzentration und die Änderung der Zellzahlen. Dies bedeutet, dass z. B. ein Metabolit mit konstanter intrazellulärer Konzentration bei Zellwachstum einen Anstieg der Konzentration pro Well aufwies. Somit entstand eine positive Korrelation vieler Metaboliten durch den Effekt des Zellwachstums und möglicherweise wurden einige negative Korrelationen durch diesen Effekt überdeckt. Dies erklärt das fehlende Auftreten von negativen Korrelationen. Da nicht für alle einzelnen Metabolitmessungen auch Zellzahlen bestimmt wurden, schloss sich der Bezug auf Zellzahlen oder Zellvolumina aus. Unabhängig von der Überlagerung des Effektes durch das Zellwachstum treten generell hohe positive Korrelationen nur auf, wenn tatsächlich ein sehr ähnliches Verhalten der Konzentrationen vorliegt. Die Tatsache, dass keine negativen Korrelationen zu finden waren, deutet an, dass sicherlich keine stark ausgeprägten inversen Verhaltensweisen von

intrazellulären Metabolitkonzentrationen vorlagen, da sonst zumindest schwache negative Korrelationskoeffizienten gefunden worden wären.

Die gewählte Anordnung der Metaboliten nach Stoffwechselwegen bot sich an, da ein Zusammenhang innerhalb dieser Wege erwartet wurde. Alternativ wurde auch zur besseren Visualisierung der Ergebnisse eine Clusteranalyse der Metaboliten entsprechend einer auf den Korrelationskoeffizienten basierenden Distanzmatrix, wie von Arkin vorgeschlagen, getestet [260-262]. Theoretisch könnten auf diese Weise neue Zusammenhänge im Stoffwechsel entdeckt werden. Da aber die Anzahl der starken Korrelationen in Abbildung 5-15 sich auf offensichtlich verknüpfte Metaboliten beschränkte, erschien eine derartige Auswertung nicht sinnvoll. In späteren Kreuzkorrelationsanalysen waren die Koeffizienten z. T. sehr hoch (s. z. B. Abbildung 5-22) und die Gefahr erschien groß, dass eine Überinterpretation durch die Clusteranalyse stattfindet, weil starke Korrelationen auch ohne offensichtliche Verbindung zwischen den Metaboliten auftreten können (falsch positive). Somit konnten bei keiner der Korrelationsanalysen aus einer weiteren Auswertung entsprechend dem Verfahrens von Arkin [260, 261] weitere Erkenntnisse gewonnen werden. Deshalb wurde auf eine Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet.

Bei den gefundenen starken positiven Korrelationen in Abbildung 5-15 handelt es sich durchwegs um Metabolitpaare, die entsprechend der Literatur durch eine schnelle reversible enzymatische Reaktion in Verbindung stehen (Glucosephosphat-Isomerase, Aconitase, Fumarase, Nukleosid-diphosphat-Kinase, UDP-GNAc-Epimerase; s. Abbildung 3-2, bidirektionale Pfeile bzw. [10, 11, 295]). Dies entspricht den theoretischen Überlegungen, dass das in allen Experimenten auftretende Gleichgewicht zwischen den Metabolitpools einen biologischen Hintergrund hat. Dies bedeutet, dass auch in den hier durchgeführten Experimenten mit MDCK- und Vero-Zellen unter den verschiedenen Bedingungen eine hohe Enzymaktivität vorlag, so dass ein chemisches Gleichgewicht zwischen den Metaboliten vorherrschte. Somit entsprechen die Ergebnisse der in der Literatur existierenden Theorie zu Gleichgewichtsreaktionen [255, 256].

Bei der Verallgemeinerung über alle hier aufgeführten Versuche ist ferner zu berücksichtigen, dass nicht die gleiche Anzahl an Versuchen für die jeweiligen unterschiedlichen Bedingungen erfolgte. Z. B. wurden deutlich mehr Experimente mit MDCK-Zellen als mit Vero-Zellen durchgeführt. Da diesbezüglich aber keine Gewichtung eingeführt wurde, spiegeln die Korrelationsdaten zum größeren Teil die Resultate von MDCK-Zellen wider als von Vero-Zellen. Allerdings besitzen insbesondere die stark blau gefärbten Felder in Abbildung 5-15 Werte für $r > 0{,}9$ und dies setzt voraus, dass die einzelnen Korrelationskoeffizienten der unterschiedlichen Experimente deutlich positive Werte aufwiesen.

Somit konnten anhand dieser Auswertung generelle Zusammenhänge zwischen Metabolitpaaren identifiziert werden, wobei sich zeigte, dass diese Ergebnisse großteils mit der Literatur im Einklang stehen.

5.3.2 Kultivierung von MDCK-Zellen

Im Laufe der Versuche zur Optimierung der Extraktionsmethode wurden bereits etliche Erkenntnisse zu den Metabolitkonzentrationen in MDCK-Zellen gewonnen und Größenordnungen für die Konzentrationen der unterschiedlichen Metaboliten wurden ermittelt. Da die Kultivierung von MDCK-Zellen aber typischerweise im *Batch*-Verfahren abläuft und somit keine stationären Bedingungen während einer Kultivierung vorherrschen, war auch bei den Metabolitkonzentrationen mit Veränderungen zu rechnen. Aus diesem Grund wurden eine Reihe von Kultivierungen in Sechs-Well Platten durchgeführt, um typische Konzentrationsverläufe von den unterschiedlichen Metaboliten während des Wachstums aufnehmen zu können.

5.3.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener Kultivierungen

Da der Rahmen der Arbeit keine Beschreibung der vollständigen Ergebnisse aller Kultivierungen erlaubt, ist hier eine Zusammenfassung der Daten aller durchgeführter Kultivierungen mit MDCK-Zellen in Form einer Kreuzkorrelationsmatrix gegeben (Abbildung 5-16). Darüber hinaus kann auf diese Weise ein generelles Bild für *Batch*-Kultivierungen von MDCK-Zellen gegeben werden. Bei dieser Korrelationsanalyse handelt es sich allerdings nicht, wie in Abbildung 5-15, um eine Korrelationsanalyse ohne Zeitverschiebung, sondern, wie in 4.5 beschrieben, um eine Kreuzkorrelation, wobei ein Zeitversatz zwischen den verschiedenen Metaboliten bzw. Variablen erlaubt ist. Diese Zeitverschiebung war allerdings nur möglich, indem eine Interpolation der Verläufe zwischen den gemessenen Datenpunkten erfolgte. Grund hierfür ist, dass ein Minimum an Datenpunkten mit äquidistantem Abstand vorhanden sein muss, um eine sinnvolle zeitliche Verschiebung zu ermöglichen. Eine genauere Erklärung der Vorgehensweise ist in Abschnitt 3.6 gegeben. Für die hier gezeigte Kreuzkorrelationsmatrix wurde jedes einzelne Experiment unabhängig von den anderen Experimenten ausgewertet. Die daraus resultierenden Korrelations- wie auch Zeitversatzmatrizen wurden anschließend gemittelt. Zwölf verschiedene Kultivierungen mit MDCK-Zellen wurden hierfür verwendet (4× GMEM-Z, 3× EpiSerf, 1× EpiSerf + 2 mM Pyruvat, 4× DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) mit unterschiedlichen Konzentrationen Glucose, Pyruvat und Glutamin). Für die experimentellen Details und die Interpolation durch Splines bzw. Boltzmann Funktionen sei auf Tabelle A 5 im Anhang verwiesen.

Es wurde die gleiche Farbkodierung gewählt wie in Abbildung 5-15. Zusätzlich zu den in Abbildung 5-15 gezeigten Metaboliten wurden in dem hier vorliegenden Diagramm einige weitere, für Kultivierungen charakteristische Kenngrößen aufgenommen. Hierbei handelt es sich unter anderem um die Zellzahl pro Well (Zellzahl), das Gesamtzellvolumen pro Well und die Konzentrationen wichtiger Metaboliten aus dem Zellkulturüberstand.

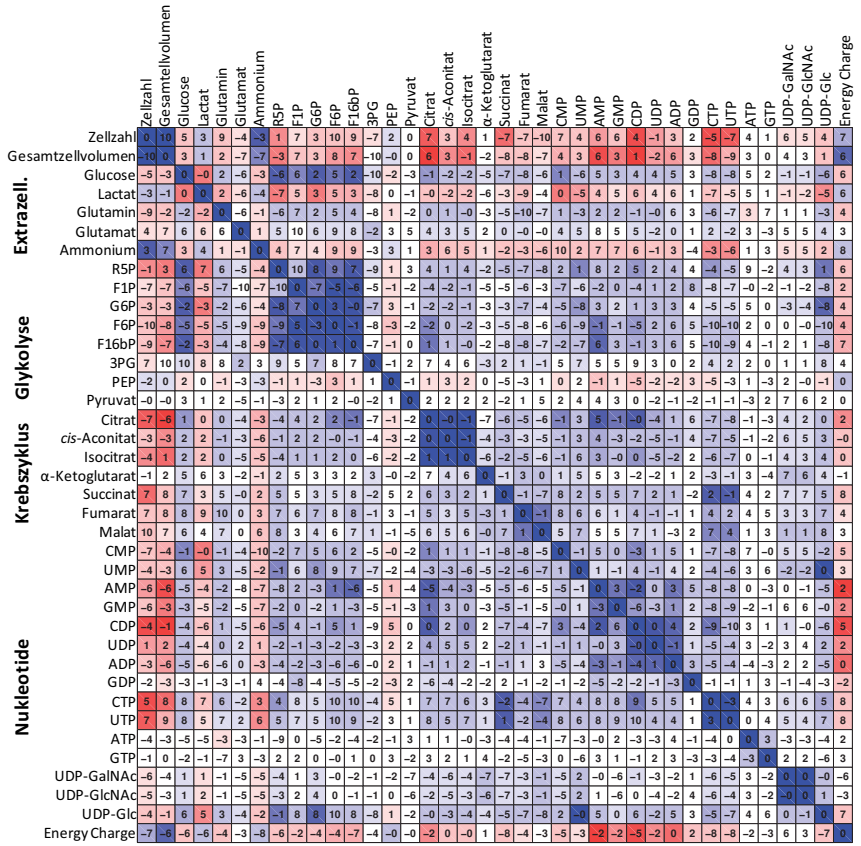


Abbildung 5-16: Kreuzkorrelationsmatrix für die Zusammenfassung der einzelnen Kreuzkorrelationsanalysen für verschiedene Kultivierungen mit MDCK-Zellen

Auf sowohl x- als auch y-Achse sind die Variablen (extra- und intrazelluläre Metabolitkonzentrationen, Zellzahl, Gesamtzellvolumen und Energy Charge) aufgetragen. In den Feldern zwischen den Variablen sind die Kreuzkorrelationskoeffizienten r (farbkodiert: blau: positiv; rot: negativ; s. in Abbildung 5-15) und der Zeitverschiebungen τ [h](Zahl) aufgetragen. Die Werte für r und τ wurden so bestimmt, dass der größte Betrag für r innerhalb des erlaubten Zeitversatzes gesucht wurde. Die Werte für τ bewegen sich somit zwischen -10 und 10 h. Bei den Werten für r und τ handelt es sich jeweils um die Mittelwerte der verschiedenen Kultivierungen (4× GMEM-Z, 3× EpiSerf, 1× EpiSerf + 2 mM Pyruvat, 4× DMEM mit unterschiedlichen Konzentrationen Glucose, Pyruvat und Glutamin). Während die Korrelationskoeffizienten r in den beiden Hälften oberhalb und unterhalb der Diagonalen (von links oben nach rechts unten) gespiegelt sind, sind die Werte für den Zeitversatz τ aus einer der beiden Hälften mit -1 zu multiplizieren, um eine Spiegelung zu erreichen; zur Interpretation der Zeitverschiebung wird die auf der y-Achse aufgetragene Variable fixiert und die auf der x-Achse aufgetragenen Variable um den Wert für τ in dem jeweiligen Feld auf der Zeitachse verschoben, um die maximale Korrelation zu erreichen. Da in der Diagonalen von links oben nach rechts unten die Korrelation jeder Variablen mit sich selbst aufgeführt ist, sind hier alle Felder mit maximaler blauer Sättigung gefärbt und enthalten einen Wert für τ = 0 als zeitlichen Versatz.

Grundsätzlich überwiegen auch in dieser Abbildung die positiven Korrelationen. Ein Großteil der intrazellulären Metaboliten war positiv miteinander korreliert, wenn auch nur schwach. Die

weiteren Variablen, wie z. B. Zellzahl oder extrazelluläre Metabolitkonzentrationen gruppierten sich deutlich in positiv und negativ korrelierende Spalten. Bei Betrachtung der Abbildung von links oben nach rechts unten fallen einige offensichtliche Korrelationen auf. So korrelierte die Zellzahl mit dem Gesamtzellvolumen positiv. Bei diesen beiden Variablen ist auch der als Zahl aufgeführte Zeitversatz einfach nachzuvollziehen. So zeigte das Gesamtzellvolumen (*y*-Achse) einen negativen Zeitversatz (-10 h) gegenüber der Zellzahl (*x*-Achse). Dies bedeutet, dass die Verlaufskurve der Zellzahl nach links auf der Zeitachse (also zu früheren Zeitpunkten) verschoben werden muss, um eine Deckung mit der Verlaufskurve des Gesamtzellvolumens zu erreichen. Zur besseren Verdeutlichung ist hier auf die zeitlichen Verläufe der Zellzahl und des Gesamtzellvolumens in Abbildung 5-18 verwiesen. Weiterhin waren die Ammoniumkonzentration und die *Energy Charge* mit den eben erwähnten Variablen (Zellzahl und Gesamtzellvolumen) positiv korreliert. Ein Großteil der weiteren Variablen ist mit dieser Gruppe allerdings negativ korreliert. Auf die zeitlichen Verschiebungen wird an dieser Stelle nur in Einzelfällen eingegangen und auf die Diskussion verwiesen.

Besonders auffällig ist der Block der Zuckerphosphate, welche stark positiv miteinander und auch mit der Glucosekonzentration korreliert war. Die Werte für die Zeitverschiebung τ für Glucose deuten einen zeitlich verzögerten Verlauf gegenüber den meisten Zuckerphosphaten an. Auch gegenüber der Zellzahl, dem Gesamtzellvolumen, Lactat und der *Energy Charge* waren die Verläufe der Zuckerphosphate zeitlich vorgelagert, jedoch bestanden hier negative Korrelationen. Besonders auffällig waren die Metaboliten 3PG, PEP und Pyruvat, welche durchwegs nur schwache Korrelationen vorwiesen. Einen Block gut korrelierender Metaboliten bildeten Citrat, *cis*-Aconitat und Isocitrat, wobei hier minimale Zeitversätze vorhanden waren. Gewisse Übereinstimmung in den Verläufen für diese Metaboliten waren für einige Zuckerphosphate und einige Nukleotide zu finden, wohingegen eine negative Korrelation zu der Zellzahl, dem Gesamtzellvolumen und der *Energy Charge* auftrat. Eine erkennbare positive Korrelation war für die weiteren organischen Säuren aus dem Krebszyklus α-Ketoglutarat, Succinat, Fumarat und Malat vorzufinden. Mehrere Nukleosidmono- und –diphosphate waren einer weiteren positiv korrelierenden Gruppe zuzuordnen. Von den Nukleosidtriphosphaten sind CTP und UTP als miteinander positiv korrelierende Metaboliten zu erwähnen, wobei der Verlauf von UTP dem von CTP voranging. Weiterhin korrelierten die Konzentrationen der beiden Zuckernukleotide UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc miteinander sehr stark und quasi ohne Zeitversatz. Grundsätzlich traten unter den intrazellulären Metaboliten keine starken negativen Korrelationen auf. Dementgegen waren bei den anderen Variablen einige stark negativ sowohl untereinander als auch mit den Konzentrationen der intrazellulären Metaboliten korreliert. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass einige Blöcke von Metaboliten auftraten, die auch in vermeintlichen metabolischen Blöcken zusammengefasst sind. Z. B. korrelierten die Intermediate des Eingangsabschnittes der Glykolyse (Hexosephosphate) miteinander oder auch einige Stoffwechselprodukte des Krebszyklus waren miteinander verknüpft. Darüber hinaus waren auch die Metabolitpaare, die in Abbildung 5-15 stark korrelierten, für die hier gezeigte Kreuzkorrelationsanalyse der Kultivierungen mit MDCK-Zellen gut korreliert. Allerdings überstiegen mitunter die Korrelationskoeffizienten der paarweisen

Korrelation aus 5.3.1 (ADP-GDP: $r = 0{,}92$; ATP-GTP: $r = 0{,}91$) die Werte der Korrelationskoeffizienten dieser Auswertung (ADP-GDP: $r = 0{,}75$; ATP-GTP: $r = 0{,}77$).

Diskussion

Diese Art der Auswertung wurde durchgeführt, um allgemein gültige Aussagen zu Zusammenhängen zwischen Metabolitkonzentrationen für *Batch*-Kultivierungen mit MDCK-Zellen treffen zu können. Bei der vorangegangenen Korrelationsanalyse (ohne Zeitverschiebung) aller Einzelmessungen aus Abschnitt 5.3.1 wurden nur wenige hohe Korrelationen zwischen Metaboliten gefunden (s. Abbildung 5-15). Wie oben bereits erwähnt, war ein möglicher Grund, dass mitunter sehr unterschiedliche Experimente und Kultivierungszustände zusammengefasst wurden, weshalb auch kein einheitliches Korrelationsverhalten für eine größere Anzahl von Metaboliten zu erwarten gewesen wäre.

Um eine Differenzierung der unterschiedlichen Versuchsbedingungen bzw. Kultivierungszustände zu erreichen, wurden die Experimente einzeln ausgewertet. Um eine zeitliche Verschiebung von Verlaufskurven berücksichtigen zu können, wurde für diese Auswertung eine Kreuzkorrelationsanalyse verwendet. Für zwölf unterschiedliche Kultivierungen mit MDCK-Zellen wurden die einzelnen Korrelationskoeffizienten und Zeitverschiebungen anschließend gemittelt. Dadurch sollte eine Generalisierung bezüglich der Korrelation von Metabolitkonzentrationen für *Batch*-Kultivierungen mit MDCK-Zellen erreicht werden. Die entsprechende Kreuzkorrelationsmatrix (Abbildung 5-16) zeigt deutlich, dass durch den hier erlaubten Zeitversatz zwischen den einzelnen Metabolitverläufen eine größere Anzahl starker Korrelationen auftraten, als in Korrelationsanalyse ohne Zeitversatz für alle Experimente (Abbildung 5-15). Dieser Effekt ist ein logisches Phänomen der Zeitverschiebung bei der Kreuzkorrelation. Typischerweise steigt der maximale Korrelationskoeffizient durch den erlaubten Zeitversatz. Besonders zu betonen ist aber auch, dass bei dieser Auswertung nur Kultivierungen mit MDCK-Zellen verwendet wurden, d. h. die Bedingungen der Versuche waren einander deutlich ähnlicher als für die in Abbildung 5-16 zusammengefassten Versuche, wo Experimente unterschiedlichster Bedingungen mit zwei Zelllinien (MDCK, Vero) gemeinsam ausgewertet wurden.

Bei der Interpretation der Kreuzkorrelationsmatrix empfiehlt sich hier, die gut bekannten Parameter wie Zellzahl, Gesamtzellvolumen und extrazelluläre Metabolitkonzentrationen zuerst zu begutachten. Zellzahl und Gesamtzellvolumen waren bei einem Zeitversatz von 10 h stark positiv miteinander korreliert. Dieser Zusammenhang zwischen Volumen und Zellzahl ist seit langem bekannt und rechnerisch sind diese Variablen durch den Faktor des Einzelzellvolumens miteinander verknüpft. Wie oben beschrieben, erfolgte normalerweise zuerst eine Volumenzunahme der Zellen, bevor der erste nachweisbare Anstieg der Zellzahl zu verzeichnen war. Dieses Phänomen entspricht den Angaben aus der Literatur, dass nach der Einsaat der Anteil der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus zunimmt, was mit einer Volumenzunahme direkt in Verbindung steht [287-289, 291, 293, 294].

Ein weiterer, gut bekannter Zusammenhang bestand zwischen den extrazellulären Konzentrationen von Glucose und Lactat. Da Glucose von MDCK-Zellen typischerweise zum Großteil in Lactat

umgesetzt wird, war die negative Korrelation zwischen diesen beiden Variablen leicht nachzuvollziehen. Ebenso ist die, wenn auch schwache, negative Korrelation zwischen Glutamin und Glutamat mit Ammonium ein gut bekanntes Phänomen.

Zellzahl und Volumen waren mit relativ vielen intrazellulären Metabolitverläufen negativ korreliert. Im Grunde spiegelt dies die Tatsache wider, dass die Zellzahl und das Volumen zu Beginn der Kultivierungen niedrige Werte aufwiesen und für viele intrazelluläre Metaboliten zu Beginn eher hohe Konzentrationen vorlagen. Im weiteren Verlauf kehrte sich dieser Zustand um. Für ein besseres Verständnis sei hier auf z. B. Abbildung 5-19 und Abbildung 5-20 in den folgenden Abschnitten verwiesen, wo diese Verlaufskurven im Einzelnen dargestellt sind. Bei Untersuchungen von Kultivierungen liegen naturgemäß zu Beginn des Versuchs niedrige Zellzahlen und gegen Ende entsprechend höhere Zellzahlen vor. Somit kann über eine biologische Ursache der negativen Korrelation der Zellzahl bzw. des Gesamtzellvolumens mit den intrazellulären Metaboliten keine Aussage getroffen werden, da kein alternatives Szenario untersucht werden kann. Theoretisch kann hier ebenso eine zufällige Koinzidenz vorliegen, was bedeutet, dass kein Zusammenhang bestehen muss.

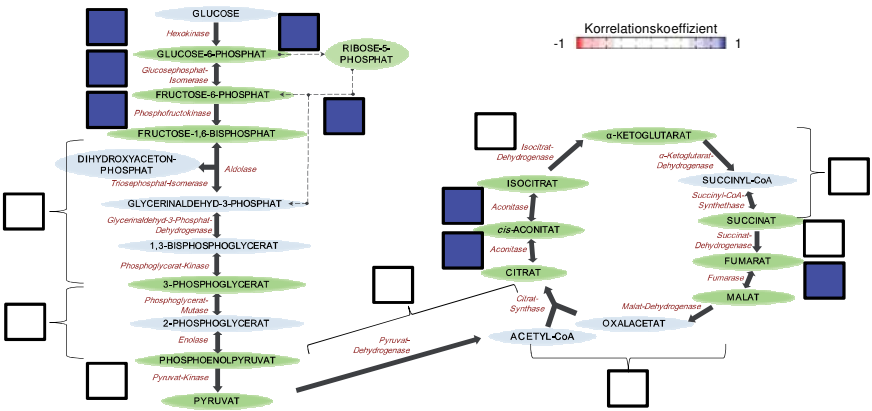


Abbildung 5-17: Schemata von Glykolyse und Krebszyklus und den farbkodierten Korrelationskoeffizienten zu den jeweiligen Metabolitpaaren für Kultivierungen von MDCK-Zellen.
Dargestellt sind nur die Korrelationen zwischen aufeinanderfolgenden Metaboliten (vgl. Abbildung 5-16).

Weiterhin zeigte sich, dass einige Metaboliten aus demselben Stoffwechselweg ein übereinstimmendes Verhalten ihrer Konzentrationsverläufe aufwiesen. Dies war grundsätzlich nicht überraschend, da Metaboliten aus demselben Stoffwechselweg mitunter auch gemeinsam oder ähnlich reguliert werden. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse sind in Abbildung 5-17 die Korrelationen für die aufeinander folgenden Stoffwechselprodukte von Glykolyse und R5P und Krebszyklus gezeigt. Insbesondere für die Glykolyse wurde ein zweigeteiltes Verhaltensmuster vorgefunden. Während der obere Abschnitt dieses Stoffwechselweges (Hexosephosphate) und R5P stark positiv miteinander korreliert waren, konnte für die Metaboliten des unteren Abschnitts kein

einheitliches Korrelationsverhalten nachgewiesen werden. Im Krebszyklus waren diejenigen Metaboliten stark korreliert, welche, wie bereits oben erwähnt, entsprechend der Literatur durch sehr aktive Enzyme (Aconitase, Fumarase) im Gleichgewicht stehen. Besonders auffällig ist in Abbildung 5-16 das Korrelationsverhalten der Metaboliten 3PG, PEP und Pyruvat. Diese Stoffwechselprodukte wiesen fast ausschließlich schwache oder keine Korrelationen zu anderen Metaboliten auf. Der Grund liegt hier sicherlich in der Tatsache, dass für diese Metaboliten deutlich unterschiedliche Verläufe in Abhängigkeit insbesondere vom Medium auftraten. Grundsätzlich deutet dies auf eine Schlüsselstelle im Metabolismus der Zellen hin, da dort scheinbar regulatorische Unterschiede in Abhängigkeit von den gewählten Versuchsbedingungen auftraten, was sich letztlich in unterschiedlichen Konzentrationsverläufen äußerte [255, 256].

Neben den positiven Korrelationen der Zuckerphosphate und einiger Metaboliten aus dem Krebszyklus waren einige relativ hohe positive Korrelationswerte für Nukleotide zu finden. Grund hierfür könnte sein, dass Nukleotide durch schnelle Gleichgewichtsreaktionen ineinander umgewandelt werden können (Nukleosiddiphosphat-Kinase, Nukleotidkinasen [295]). Gerade bei Triphosphaten war eine klare Unterscheidung zwischen den Pyrimidinnukleotiden (CTP und UTP) und den Purinnukleotiden (ATP und GTP) zu erkennen, die sich entsprechend gruppieren ließen. Dies stimmt mit der Literatur überein, so haben bereits Ryll und Wagner (1992) eine entsprechende Gruppierung dieser Metaboliten bei der Charakterisierung von Produktionszelllinien eingeführt, um das gleichartige Verhalten gemeinsam zu beschreiben [219]. Diphosphate hingegen ließen sich nicht derart gruppieren. Mit Ausnahme von ATP und GTP waren alle Nukleotide positiv untereinander korreliert. ATP und GTP zeigten nur geringe Korrelationskoeffizienten zu anderen Metaboliten. Grund hierfür könnte die relativ konstante Konzentration dieser beiden Metaboliten über die Kultivierungsdauer sein, während die meisten anderen Metaboliten deutliche Konzentrationsänderungen durchliefen.

Insgesamt überwogen in dieser Matrix jedoch die positiven Korrelationen, was sich besonders auffällig für die intrazellulären Metabolitkonzentrationen zeigte. Grundsätzlich schien somit ein übergeordneter Parameter diese Konzentrationen maßgebend zu beeinflussen. Mehrere mögliche Gründe hierfür können genannt werden. Erstens könnten die unterschiedlichen Metabolitkonzentrationen direkt mit der metabolischen Aktivität der Zellen korreliert gewesen sein. Dies bedeutet, dass zu Beginn der Kultivierungen eine hohe Stoffwechselaktivität vorlag und im Laufe der Versuche diese Aktivität sank. So waren die zellspezifische Glucose- und Glutaminaufnahmeraten stark negativ und die Lactat- und Ammoniumausscheidungsrate stark positiv mit vielen Metaboliten, insbesondere den Zuckerphosphaten und einigen organischen Säuren korreliert (nicht gezeigt). Somit waren diese Raten hoch, wenn auch die intrazellulären Konzentrationen hoch waren.

Zweitens könnte durch die unterschiedliche Zellzyklusphasenverteilung über die Kultivierungsdauer ein für alle Metaboliten einheitlicher Einfluss auf die Konzentrationen über die Kultivierung bedingt gewesen sein. Für Hefen ist eine Korrelation zwischen Zellzyklus und Metabolitkonzentrationen bekannt [139]. Dies könnte bedeuten, dass bei einer hohen Wachstumsrate hohe Konzen-

trationen der Stoffwechselintermediate vorlägen und wenn die Zellen sich nicht mehr teilen, wären die Konzentrationen entsprechend niedrig. Wie weit die Stoffwechselaktivität und die Zellteilungsaktivität sich gegenseitig beeinflussten, kann basierend auf den durchgeführten Experimenten nicht beurteilt werden.

Drittens kann theoretisch als Ursache der qualitativen Übereinstimmung der Konzentrationsverläufe ein systematischer Fehler bei der Bestimmungsmethode nicht komplett ausgeschlossen werden. Allerdings sprechen die Ergebnisse der verschiedenen Kurzzeitexperimente (s. Abschnitt 5.3.4) dem deutlich entgegen, da dort ein weitgehend entkoppeltes Verhalten der Metaboliten gezeigt werden konnte.

Grundsätzlich ließ sich erkennen, dass eine starke Korrelation, unabhängig davon, ob negativ oder positiv, nicht zwingend mit einer direkten Verbindung der Variablen zueinander erklärt werden kann. So können hohe Korrelationswerte auch schlichtweg durch ein zufällig gleiches oder entgegengesetztes Verhalten der Variablen herrühren.

Bei der Interpretation des zeitlichen Versatzes von Konzentrationsverläufen ist Folgendes zu beachten. Ein zeitlicher Versatz von mehreren Stunden für die Verläufe zweier im Stoffwechsel aufeinander folgender Metaboliten kann nicht durch ein verzögertes Einstellen des Gleichgewichts durch die enzymatische Reaktion erklärt werden. Das bedeutet, dass man in zeitlich verschobenen Verläufen nicht das aufeinander folgende Abbauen eines Substrates erkennen kann. Vielmehr muss hier eine Regulation auf Ebene der Proteinaktivität, Translation oder Transkription erfolgen und es bestehen zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Gleichgewichte zwischen den Stoffwechselprodukten.

In den Korrelationsmatrizen konnte zwar ein gleichartiges Verhalten von Metabolitkonzentrationen identifizieren werden, aber die konkreten Verläufe und Konzentrationen sind bei dieser Form der Darstellung nicht auszumachen. Aus diesem Grund wird im folgenden Abschnitt der Vergleich Kultivierungen in zwei verschiedenen Zellkulturmedien in detaillierterer Form inklusive der einzelnen zeitlichen Verläufe beschrieben.

5.3.2.2 Kultivierung in GMEM-Z bzw. EpiSerf Medium

Die Gruppierung der Verläufe einiger Metaboliten war durch die vorangegangenen Korrelationsanalysen bereits möglich. Allerdings ist aus den Korrelationsmatrizen keine Information über die tatsächlichen zeitlichen Verläufe und die Konzentrationen zu gewinnen. Aus diesem Grund erfolgt hier eine detaillierte Beschreibung der Kultivierungen in den Medien GMEM-Z (serumhaltig) und EpiSerf (serumfrei). Diese beiden Medien unterschieden sich aber nicht nur im Serumgehalt, sondern auch in einer ganzen Reihe von Inhaltsstoffen, wie z. B. der Glucosekonzentration oder auch den Konzentrationen von Aminosäuren. Dadurch sollte das zu erwartende Spektrum der physiologischen intrazellulären Metabolitkonzentrationen, ausgelöst durch Nährmedien, möglichst weit ausgeschöpft werden. Es wurde eine gemeinsame Vorkultur in GMEM-Z für beide Kultivierungsansätze verwendet, um von identischem Zellmaterial für die Einsaat ausgehen zu können.

Zellwachstum

Es wurden je drei Kultivierungen in Sechs-Well Platten durchgeführt. Die drei verschiedenen Versuche wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit unterschiedlichen Vorkulturen gestartet. Einsaatzelldichten waren für Experiment GMEM-Z1 $0{,}66 \times 10^6$ Zellen/Well, EpiSerf1 $0{,}64 \times 10^6$ Zellen/Well, GMEM-Z2 $0{,}45 \times 10^6$ Zellen/Well, EpiSerf2 $0{,}43 \times 10^6$ Zellen/Well, GMEM-Z3 $0{,}74 \times 10^6$ Zellen/Well, EpiSerf3 $0{,}71 \times 10^6$ Zellen/Well. Neben den Zellzahlen wurden, wie in Abschnitt 5.2.6 beschrieben, auch die Zelldurchmesser durch das Gerät ViCell XR bestimmt (Daten nicht gezeigt). Somit konnte durch Multiplikation der Zellzahlen mit den errechneten Einzelzellvolumina das bereits oben erwähnte Gesamtzellvolumen der Zellen in einem Well ermittelt werden. Die Verläufe der Zellzahlen und der Gesamtzellvolumina der Zellen der verschiedenen Kultivierungen für GMEM-Z und EpiSerf sind in Abbildung 5-18 dargestellt.

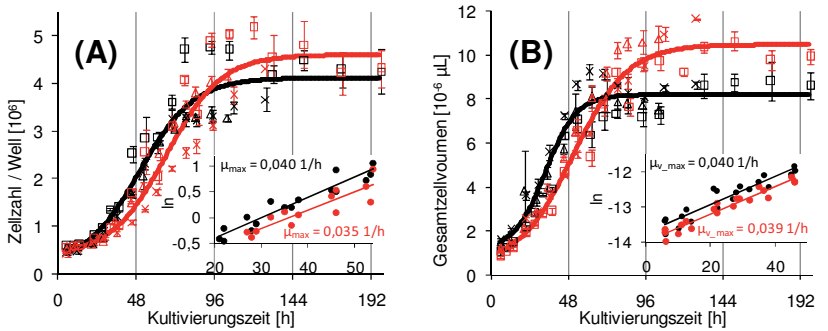


Abbildung 5-18: Verläufe der Zellzahl (A) des Gesamtzellvolumens (B) für die zwei Medien GMEM-Z (schwarz) und EpiSerf (rot).

Für drei unabhängige Kultivierungen; 1: ×, 2: Δ, 3: □. Zellzahl und Gesamtzellvolumen wurden bestimmt durch die Messung trypsinierter Zellen mit dem Gerät ViCell XR. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis der Anpassung einer sigmoiden Funktion (Boltzmann) an die Werte der drei Kultivierungen für jedes Medium; Fehlerbalken deuten die Standardabweichung der dreifachbestimmten Proben an; die Ausschnitte zeigen die logarithmierten Zellzahlen bzw. Volumina im Bereich des exponentiellen Wachstums und die lineare Anpassung zur Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{max} bzw. μ_{v_max}.; die Datenpunkte aller Experimente sind hier als Kreis dargestellt (●).

Deutliche Unterschiede zwischen den beiden Medien sind bei den Verläufen zu erkennen. Die lag-Phase war für die Kultivierungen in EpiSerf eindeutig länger. Die maximale spezifische Wachstumsrate während des exponentiellen Wachstums wurde bestimmt durch Bilden des Logarithmus der Zellzahlen (bzw. des Gesamtzellvolumens) und lineare Regression im Zeitraum von 21 – 54 h für GMEM-Z und war $\mu_{max} = 0{,}040$ 1/h (volumenbezogen: 6 – 46 h, $\mu_{v_max} = 0{,}040$ 1/h). Für EpiSerf wurde ein Zeitraum von 27 – 54 h für die Ermittlung der maximalen spezifischen Wachstumsrate genutzt und ein $\mu_{max} = 0{,}035$ 1/h ermittelt (6 – 46 h, $\mu_{v_max} = 0{,}039$ 1/h). Basierend auf diesen Regressionen wurde eine Kovarianzanalyse zur Prüfung der Parallelität der Regressionsgeraden durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Geradensteigungen existiert (t-Test: zellzahlbezogen: $p = 0{,}24$; volumenbezogen: $p = 0{,}41$). Zu bemerken ist hier, dass keine identischen Zeiträume für das exponentielle Wachstum gewählt werden konnten, da sonst keine Linearität gegeben gewesen wäre.

Insbesondere war auffällig, dass für das Gesamtzellvolumen der lineare Bereich bereits bei der ersten Probennahme nach ca. 6 h begann, wohingegen bei der Zellzahl erst nach etwa 20 h das exponentielle Wachstum anfing. Die erreichten maximalen Zellzahlen waren für EpiSerf höher (ca. $4{,}4 \times 10^6$ Zellen/Well; Mittelwert der Zellzahlen ab 94 h) als für GMEM-Z (ca. $4{,}0 \times 10^6$ Zellen/Well). Bei den Zellzahlen zeigte sich allerdings, dass für GMEM-Z3 und EpiSerf3 erheblich höhere Werte erzielt wurden, als für die beiden vorhergehenden Kultivierungen. Beim Vergleich der beiden Medien bezüglich der mittleren Zellzahl im Zeitraum nach 94 h durch einen gepaarten t-Tests konnte ein signifikanter Unterschied ($p = 0{,}0043$) nachgewiesen werden.

Ein Vergleich der Reststandardabweichungen s_y der sigmoiden Anpassungen für beide Medien (nach Normierung der Zellzahlen eines Mediums gemäß: $Zellzahl_{normiert}$ = *(Zellzahl – mittl. Zellzahl der Kultivierung) / SD der Kultivierung*) zeigte, dass die Werte für die Gesamtzellvolumina in einem engeren Band um die sigmoide Näherungsfunktion lagen als für die Zellzahlen (vgl. Abbildung 5-18). So wurde für GMEM-Z eine Reststandardabweichung der Zellzahlen $s_{y_ZZ} = 0{,}274$ und für die Volumina $s_{y_Vol} = 0{,}263$ (kein signifikanter Unterschied gemäß F-Test: $p = 0{,}398$) ermittelt. Für EpiSerf ergaben sich Werte für $s_{y_ZZ} = 0{,}269$ und $s_{y_Vol} = 0{,}198$ (signifikanter Unterschied gemäß F-Test: $p = 0{,}025$). Ein Grund für die bessere Übereinstimmung der Verläufe der verschiedenen Kultivierungen für das Gesamtzellvolumen war, dass in Kultivierung 3 die Zellzahlen pro Well deutlich höher lagen, aber dementgegen waren die Zellvolumina geringer. Auf diese Weise wurde die höhere Zellzahl durch das niedrigere Volumen kompensiert.

Wie oben erwähnt, wurden die chromatographisch bestimmten Metabolitgehalte in den einzelnen Wells auf die zum gleichen Zeitpunkt ermittelten Gesamtzellvolumina bezogen, wodurch eine intrazelluläre Konzentration berechnet wurde.

Diskussion

Zu berücksichtigen ist bei den hier erzielten Ergebnissen, dass für die Kultivierung in EpiSerf-Medium keine Adaptation der Zellen an das Medium durchgeführt wurde. Typischerweise verändert sich das Wachstumsverhalten von kultivierten Zellen bei Umstellung auf ein neues Medium, allerdings erst bei mehrmaliger Passagierung. Grund für die nicht durchgeführte Adaptation war, dass ein identisches Zellausgangsmaterial für die zu vergleichenden Medien verwendet werden sollte. Die beiden untersuchten Medien wiesen neben dem unterschiedlichen Serumgehalt weitere deutliche Unterschiede in ihren Zusammensetzungen auf, wie z. B. in der Konzentration der Glucose oder von Aminosäuren. Durch die Verwendung von Medien mit deutlichen Unterschieden in der Zusammensetzung sollte ein möglichst weites Spektrum von intrazellulären Metabolitkonzentrationen bei gutem Zellwachstum erzielt werden. Da diese Medien bereits mit guten Erfahrungen für die Kultivierung von MDCK-Zellen eingesetzt wurden, lag die Verwendung dieser Medien nahe. Diese positiven Erfahrungen bezüglich des Zellwachstums konnte auch für alle hier gezeigten Kultivierungen bestätigt werden, so waren die erreichten maximalen spezifischen Wachstumsraten und Zellzahlen pro Well in dem für adhärente Zellen erwarteten Bereich (s. Abbildung 5-18 (A)). Dennoch waren auch klare Unterschiede zwischen den

einzelnen Versuchen zu erkennen. Mehrere Ursachen kamen für diese Differenzen in Frage. Als erstes waren wahrscheinlich die unterschiedlichen Startzellzahlen (s. Seite 112) von großer Bedeutung für den Verlauf der Wachstumskurven. Ob grundsätzlich ein Einfluss der Startzellzahlen auf die maximale Zellzahl besteht, kann hier nicht beantwortet werden. Als zweite Einflussgröße ist sicherlich die Kultivierungsbedingung der Vorkultur relevant. Aus logistischen Gründen war es für diese Versuche nicht möglich, identische Vorkulturen einzusetzen. Dies hatte zur Folge, dass für die Kultivierungen 1 und 2 T-Flaschen verwendet wurden, für Kultivierung 3 Rollerflaschen. Auch das Alter der Vorkulturen war nicht einheitlich (1: 6 Tage; 2: 3 Tage; 3: 4 Tage). Gerade auf das maximale erreichte Gesamtzellvolumen schien die Vorkultur einen Einfluss zu haben. Mit zunehmendem Alter der Vorkultur war das maximal erreichte Volumen während einer Kultivierung geringer. Zusätzlich schienen die maximalen Zellvolumina bei Vorkultur in T-Flaschen größer gewesen zu sein als in Rollerflaschen. Dies wurde auch in weiteren Experimenten beobachtet (nicht gezeigt). Eine systematische Untersuchung dieses Phänomens bleibt durchzuführen. Als dritte Ursache für unterschiedliches Zellwachstum kommen sicherlich eine Variabilität des Serums bzw. des Hydrolysates in Frage. Verschiedene Mediencharge kamen zum Einsatz, da diese Versuche in einen Zeitraum von mehreren Monaten nacheinander durchgeführt wurden.

Die maximalen spezifischen Wachstumsraten für die beiden Medien waren nicht signifikant unterschiedlich. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass sich die maximalen spezifischen Wachstumsraten für das gleiche Medium aber für verschiedene Versuche mitunter deutlich unterschieden. Aus diesem Grund waren die Schwankungen für ein Medium durch die gemeinsame Auswertung der drei verschiedenen Versuche höher, als sie tatsächlich bei einer Kultivierung aufgetreten wären. Zu bemerken ist, dass auch für jeden einzelnen Versuch die maximale spezifische Wachstumsrate für GMEM-Z höher oder gleichhoch wie in EpiSerf war (Auswertung nicht gezeigt). Somit mochten zwar bei dieser Auswertung im statistischen Sinne keine signifikanten Unterschiede zwischen den maximalen spezifischen Wachstumsraten in den beiden Medien vorgelegen haben, dennoch deutete sich eine zumindest geringfügig höhere spezifische Wachstumsrate in GMEM-Z an. Als Grund hierfür kann sicherlich der Zusatz von Serum in diesem Medium vermutet werden. Ein interessanter Aspekt ist der unterschiedliche Zeitraum des exponentiellen Wachstums für die beiden Variablen Zellzahl und Gesamtzellvolumen. Wie bereits im Zusammenhang mit der Kreuzkorrelationsanalyse aus dem vorangegangenen Abschnitt erwähnt, ist eine Erklärung, dass der Zellteilung eine Volumenvergrößerung der Zellen vorausgeht. Aus den Daten ist zu erkennen, dass diese bereits nach 6 h in beträchtlichem Maße erfolgt war. Dies bedeutet, dass die Zunahme der Biomasse deutlich früher eintrat, als die Abbildung 5-18 (A) erahnen lässt. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten aus der Literatur für Hybridoma-Zellen gut überein [287-289, 291]. Wie bereits oben erwähnt, war diese Information bezüglich des das Gesamtzellvolumens im Hinblick auf die Bestimmung von intrazellulären Metabolitkonzentrationen wichtig.

Beim Vergleich der Medien bezüglich der maximal erreichten Zellzahlen pro Well wurden signifikant höhere Werte für EpiSerf Medium gemessen (s. Seite 113). Hierbei basierte die Prüfung auf signifikante Unterschiede auf den Probenahmen ab 94 h. Dies bedeutet, dass eine konstante

Zellzahl und eine Normalverteilung der Zellzahlen ab 94 h angenommen wurden. Aus Erfahrungswerten für Kultivierungen in Sechs-Well-Platten schien diese Annahme gerechtfertigt. Eine Erklärung für die unterschiedlichen maximalen Zellzahlen kann nicht gegeben werden. Grundsätzlich wurde angenommen, dass die maximale Zellzahl von der gebotenen Wachstumsfläche und der Grundfläche, die eine Zelle einnimmt, bestimmt wird. Noch offensichtlicher ist der Unterschied des Gesamtzellvolumens für die beiden Medien. Da das Volumen nach Trypsinierung und nach Abstoppen der Trypsinierungsreaktion ermittelt wurde und beide Kultivierungsansätze identisch behandelt wurden, scheidet die geringfügig unterschiedliche Osmolalität der beiden Medien als Ursache für die Volumenunterschiede aus. Als mögliche Erklärung kann eine unterschiedliche Wachstumsgrundfläche der Zellen angegeben werden. Dies würde bedeuten, dass die in EpiSerf kultivierten Zellen eine geringere Fläche bei sogar größerem Gesamtzellvolumen am Ende der Kultivierung einnahmen. Ein Grund hierfür kann sein, dass im serumfreien Medium die Anheftungsfaktoren fehlten, die eine stärkere Ausbreitung der Zellen im serumhaltigen Medium förderten. Eine experimentelle Bestätigung dieser Hypothese kann nicht gegeben werden. Bei Kultivierung auf Mikrocarriern sind in der Literatur diesbezüglich widersprechende Ergebnisse zu finden. So wurden für Vero- und MDCK-Zellen in serumfreien Medien niedrigere Zellkonzentrationen gefunden [20, 296]. Allerdings herrschen typischerweise deutlich unterschiedliche Bedingungen für die Kultivierung im Bioreaktor im Vergleich mit statischer Kultur, insbesondere die Zellanheftung betreffend.

Beim Vergleich der einzelnen Versuche für ein Medium erwies sich das Gesamtzellvolumen als ein besser reproduzierbarer Wert als die Zellzahl. Dies zeigte sich insbesondere bei EpiSerf in dem signifikanten Unterschied der Reststandardabweichungen der sigmoiden Anpassung an die Verläufe von Zellzahl und Gesamtzellvolumen. Ein Grund für die bessere Reproduzierbarkeit des Verlaufs des Gesamtzellvolumens verglichen mit dem Verlauf der Zellzahl könnte sein, dass für den Fall einer hohen Zellzahl das Gesamtzellvolumen der einzelnen Zellen kleiner und für eine niedrige Zellzahl das Volumen der einzelnen Zellen entsprechend größer war. Somit scheint ein maximaler Wert des Gesamtzellvolumens für jedes Medium zu existieren.

Konzentrationsverläufe extrazellulärer Metaboliten

Eine Zusammenfassung von Konzentrationsverläufen sowohl extrazellulärer und intrazellulärer Metaboliten ist in Abbildung 5-19 gegeben. Bei den extrazellulären Stoffwechselprodukten handelt es sich um die wichtigsten Substrate (Glucose, Glutamin, Glutamat) und Abfallprodukte (Lactat, Ammonium). Die Verläufe der Substrate zeigen deutliche Unterschiede in der Medienzusammensetzung. Während in GMEM-Z ein Anfangswert von Glucose von über 30 mM vorlag, war in EpiSerf eine Startkonzentration von etwa 8 mM zu finden. Ebenso lag die Konzentration von Glutamin in GMEM-Z deutlich höher (1,7 mM) als in EpiSerf (0,6 mM). Im Gegensatz dazu war die Konzentration von Glutamat in EpiSerf (1,4 mM) erheblich höher als in GMEM-Z (0,5 mM).

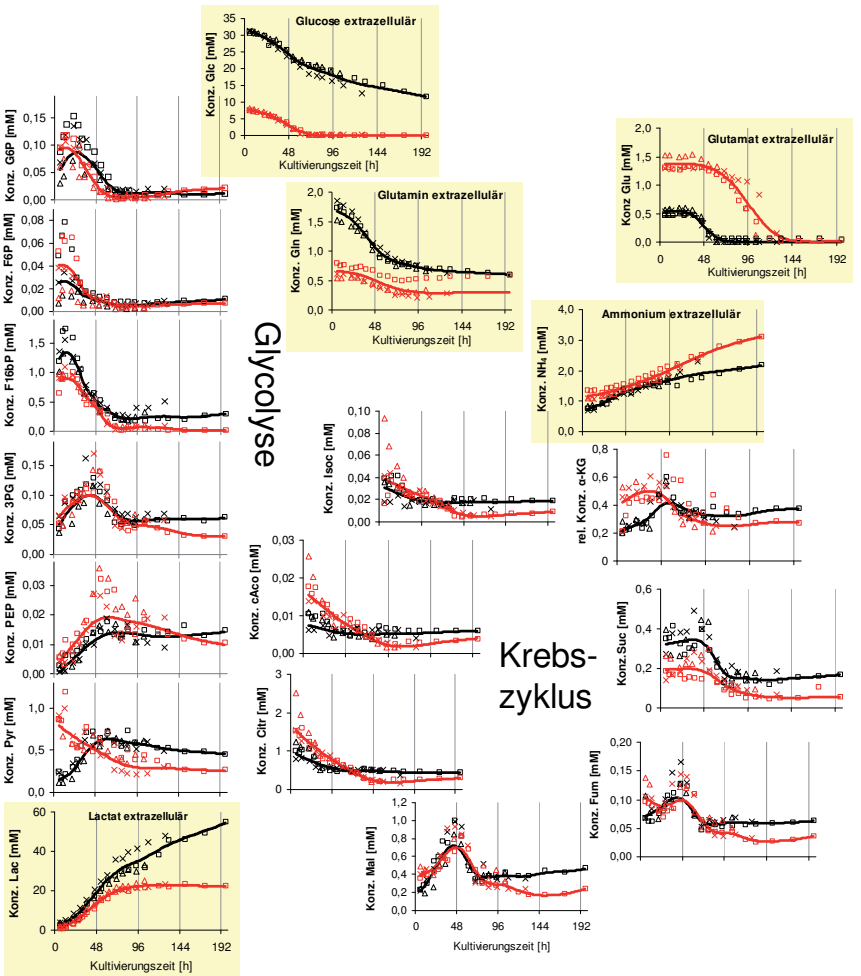


Abbildung 5-19: Verläufe von extra- und intrazellulären Metabolitkonzentrationen bei Kultivierung von MDCK-Zellen in GMEM-Z (schwarz) und EpiSerf (rot).

Extrazelluläre Metabolitkonzentrationen sind gelb hinterlegt; intrazelluläre Konzentrationen sind berechnet durch Bezug der pro Well gemessenen Menge auf das zelluläre Gesamtvolumen; die Anordnung der einzelnen Diagramme erfolgte gemäß des gängigen Schemas des Zentralstoffwechsels; drei unabhängige Experimente wurden in Sechs-Well Platten durchgeführt (verschiedene Symbole, s. Abbildung 5-18). Bei den gezeigten Messpunkten handelt es sich um den Mittelwert aus drei unabhängigen Wells einer Sechs-Well Platte. Der Übersichtlichkeit halber wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet und für die Präzision der Messungen sei für die extrazellulären Metaboliten auf Tabelle 4-1 und für die intrazellulären Messungen auf Tabelle A 12 verwiesen.

Für die Verläufe ergab sich folgendes Bild. Nach kurzer Verzögerung nahm die Glucosekonzentration in etwa den ersten 70 h der Kultivierung stark ab. Im Anschluss war die Aufnahme von Glucose in GMEM-Z verringert. In EpiSerf war nach ca. 70 h die Glucose vollständig verbraucht.

Die extrazelluläre Lactatkonzentration stieg anfänglich (< 12 h) langsam und im Zeitraum von etwa 12 h bis 70 h relativ stark an, wobei der Verlauf in GMEM-Z einen steileren Anstieg zeigte. Nach 70 h war in GMEM-Z eine Abflachung des Anstiegs zu erkennen, dennoch fand eine weitere Konzentrationszunahme bis zu einem Wert von etwa 50 mM statt. Für die Kultivierung in EpiSerf zeigte sich nach 70 h ein Ende der Konzentrationszunahme (max. ca. 20 mM), was einherging mit dem Zeitpunkt des kompletten Verbrauchs von Glucose.

Einen mit Glucose vergleichbaren Konzentrationsverlauf zeigte Glutamin für beide Medien. Für GMEM-Z war nach etwa 70 h bei einer Konzentration von ca. 0,7 mM eine deutliche Reduktion des Verbrauchs zu verzeichnen und im weiteren Verlauf war ein geringer Abfall der Konzentration zu sehen. Der deutliche Unterschied des Glutaminverlaufs in EpiSerf3, verglichen mit EpiSerf1 und 2 wird weiter unten diskutiert. Die Konzentration von Glutamat war für beide Medien in den ersten 30 h (GMEM-Z) bzw. 45 h (EpiSerf) konstant und fiel anschließend in einem steilen Verlauf auf einen Wert von etwa null. Durch einerseits die höhere Anfangskonzentration in EpiSerf aber auch ein längeres konstantes Niveau zu Beginn der Kultivierung, war Glutamat in EpiSerf erheblich später (120 h) verbraucht als für GMEM-Z (60 h). Wie oben erwähnt, dienen typischerweise Glutamin und Glutamat als Energiequellen. Nach Desaminierung bzw. Transaminierung können beide Aminosäuren über α-Ketoglutarat im Krebszyklus teilweise oder vollständig abgebaut werden. In Abbildung 5-19 ist der Verlauf der Ammoniumkonzentration im Zellkulturüberstand gezeigt. Für beide Medien wurde ein klarer Anstieg gemessen. Das Diagramm zeigt für GMEM-Z einen relativ kontinuierlichen Anstieg der Konzentration. Gegen Ende des Versuchs lag die Konzentration bei 2 mM. Für die EpiSerf-Kultivierung wurde in den ersten 70 h ein steilerer Konzentrationsanstieg gemessen und anschließend war der Anstieg etwas vermindert. Bei 198 h wurde einen Wert von ca. 3 mM erreicht.

Zur genaueren Charakterisierung der beiden Kultivierungen wurden die Verhältnisse von Lactat zu Glucose und Ammonium zu sowohl Glutamin als auch den beiden Aminosäuren Glutamin und Glutamat gebildet (Tabelle 5-6). Alle drei Verhältnisse unterschieden sich deutlich für die zwei Medien. Für EpiSerf waren die Verhältnisse höher, insbesondere für das Verhältnis von Ammonium zu Glutamin.

Tabelle 5-6: Zusammenfassung der Verhältnisse von Produkten zu Edukten des Energiestoffwechsels für das Zellwachstum von MDCK-Zellen in Sechs-Well Platten in GMEM-Z bzw. EpiSerf

	$Y_{Lac/Glc}$	$Y_{Amm/(Gln \times 2)*}$	$Y_{Amm/(Gln \times 2 + Glu)*}$
GMEM-Z	2,64	0,67	0,53
EpiSerf	2,81	2,70	0,94

* *da bei vollständigem Abbau von Gln 2 mol Amm freigesetzt werden, ist hier der Faktor 2 eingefügt*
Die Berechnung erfolgte anhand der Differenzbildung des ersten und des letzten Wertes der geglätteten Werte

Diskussion

Die in Abbildung 5-19 gezeigten Verläufe der extrazellulären Metabolitkonzentrationen wiesen erhebliche Unterschiede für die beiden Medien auf. Dies ist unter anderem auf die unterschiedlichen Anfangskonzentrationen der Hauptsubstrate Glucose, Glutamin und Glutamat zurückzuführen. Des

Weiteren lagen die Konzentrationen der meisten weiteren Aminosäuren in EpiSerf deutlich höher als in GMEM-Z (nicht gezeigt), wovon der Stoffwechsel höchstwahrscheinlich auch beeinflusst war. Die Verläufe der extrazellulären Metabolitkonzentrationen erwiesen sich als relativ gut reproduzierbar, wie die drei unabhängigen Experimente zeigten. Die Ursache für die Unterschiede der Konzentrationsverläufe von Glucose und Lactat zwischen den einzelnen Versuchen bei gleichem Medium waren höchstwahrscheinlich bedingt durch die biologische Variabilität, die sich z. B. auch in den nicht identischen Zellzahlen widerspiegelte.

Die Verläufe von Glutamin und Glutamat waren im jeweils gleichen Medium qualitativ sehr ähnlich. Allerdings wurden zum Teil deutliche Unterschiede in der Startkonzentration gemessen, die bis zum Ende der Kultivierungen bestehen blieben. Als Ursache wird hier ein systematischer Messfehler vermutet, der durch eine nicht konstante Arbeitsweise der Enzymmembranen des Gerätes Bioprofile verursacht worden sein könnte. Nichtsdestotrotz wurde davon ausgegangen, dass durch die gemeinsame Glättung und Interpolation der drei Datensätze anhand der Boltzmann Funktion bzw. des Splines ein relativ guter, repräsentativer Verlauf der Daten wiedergegeben wurde. Durch die unterschiedlichen Laufzeiten der Versuche war es aber nötig, die Daten vor der Glättung zu gewichten, um artifizielle Sprünge in den Verläufen zu vermeiden. Dies erklärt das mitunter deutliche Abweichen der Interpolationskurve von den Messwerten in Abbildung 5-19.

Bei Betrachtung des Verhältnisses von produziertem Lactat zu verbrauchter Glucose ist auffällig, dass das theoretische Maximum von 2 mol Lactat zu 1 mol Glucose für beide Medien deutlich überschritten wurde. Verglichen mit der Literatur im Allgemeinen [40, 50, 84, 297], aber auch mit Versuchen mit der gleichen Zelllinie [19-21, 48, 78] sind diese Werte erhöht. Dies würde bedeuten, dass neben Glucose auch andere Substrate zu Lactat abgebaut wurden. Zum Teil könnte dieses Ergebnis durch die Verdunstung aus Sechs-Well Platten während der Kultivierung beeinflusst gewesen sein. Da durch diesen Volumenverlust die gemessene Konzentrationsdifferenz von Glucose verringert und für Lactat erhöht worden wäre, wäre der Ausbeutekoeffizient von Lactat zu Glucose verstärkt dadurch beeinträchtigt. Bei Kultivierung in einem befeuchteten Brutschrank wurde die durchschnittliche Verdunstung pro Tag in verschiedenen Versuchen abgeschätzt (Daten nicht gezeigt), wobei sich ein Wert von 2,75 µL/h/Well ergab. Somit würde über die gesamte Kultivierungsdauer von z. B. 192 h ein Volumen von 528 µL von dem Anfangsvolumen von 4000 µL verdunsten. Dies würde bedeuten, dass das reale Verhältnis von Lactat zu Glucose in GMEM-Z anstelle von 2,64 bei 2,11 lag und für EpiSerf anstelle von 2,81 bei 2,43. Diese Werte erscheinen deutlich plausibler. Dennoch liegen auch diese Werte deutlich über dem theoretischen Maximum von 2. Ursache hierfür kann sein, dass auch Glutamin und anderen Aminosäuren zu Lactat umgesetzt werden können [40, 42], was ein Verhältnis von > 2 zur Folge haben kann. Eine generelle Antwort auf die Frage, unter welchen Bedingungen und für welche Zellen eine solche metabolische Umsetzung stattfindet, kann damit nicht gegeben werden. Allerdings spielt sicherlich das Kultivierungssystem und die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff eine Rolle. Während ein Großteil der Literatur, die sich auf stöchiometrische Ausbeutekoeffizienten bezieht, von Studien in Bioreaktoren oder Rollerflaschen berichtet, fanden die in der hier vorliegenden Arbeit

durchgeführten Kultivierungen in Sechs-Well Platten, also statischen Kulturen statt. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die Kultivierungsbedingungen unterscheiden, insbesondere bezüglich der Versorgung mit Sauerstoff. Bei einem Volumen von 4 mL Medium pro Well in Sechs-Well Platten kann eine Limitation der Sauerstoffversorgung auftreten, da die Diffusion des Sauerstoffs durch die Flüssigkeit eine Beschränkung darstellt [298, 299]. Grundsätzlich ist die Höhe der Flüssigkeit über dem Zellrasen von entscheidender Bedeutung. Bei Annahme eines zellspezifische Sauerstoffverbrauchs für MDCK-Zellen zwischen $8{,}35 \times 10^{-14}$ mol/Zelle/h [300] und $15{,}60 \times 10^{-14}$ mol/Zelle/h [301] und einer maximalen Zellzahl pro Fläche von 4×10^5 Zellen/cm^2, ergäbe sich eine maximale Flüssigkeitshöhe von 0,68 bis 0,36 cm, bei welcher eine Sauerstoffversorgung der Zellen gewährleistet wäre. Dies würde bedeuten, dass im schlechtesten Falle dieser Berechnung keine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen für die gezeigten Versuche mehr gegeben gewesen wäre. Gstraunthaler et al. führte Versuche in statischen Systemen durch, wobei die Auswirkungen unterschiedlicher Glucosekonzentrationen und Mediumvolumina auf den Metabolismus von kultivierten Nierenzellen (aus Schwein bzw. Opossum) untersucht wurden [74]. Unter anderem wurden dort Verhältnisse von Lactat zu Glucose > 2, insbesondere bei größeren Flüssigkeitshöhen beobachtet.

Auch das Verhältnis von Ammonium zu Glutamin war verglichen mit der Literatur erhöht [14, 40, 48, 78]. Typische Werte bewegen sich hier zwischen 0,2-0,5 (bei Berücksichtigung des Faktors 2 für Glutamin) bei einem theoretischen Maximum von 1, wenn neben Glutamin keine weiteren Aminosäuren abgebaut werden. Ebenso wie für den Ausbeutekoeffizienten für Lactat zu Glucose ist das Verhältnis von Ammonium zu Glutamin durch die Verdunstung beeinflusst. Bei Berücksichtigung der oben erwähnten Verdunstung ergäbe sich für GMEM-Z ein Wert von 0,50 und für EpiSerf von 1,92. Da aber auch eine beträchtliche Menge an Glutamat bei den Kultivierungen in EpiSerf verbraucht wurde, ist in Tabelle 5-6 auch das Verhältnis von Ammonium zu Glutamin (× 2) und Glutamat gezeigt. Theoretisch kann hier ein maximaler Wert von 1 erreicht werden, für den Fall, dass nur die beiden aufgeführten Aminosäuren abgebaut werden und dabei der komplette Stickstoff in Form von Ammonium freigesetzt wird. Bei Berücksichtigung der Verdunstung für dieses Verhältnis ergeben sich Werte von 0,40 (GMEM-Z) und 0,71 (EpiSerf). Auch diese Werte sind relativ hoch verglichen mit Werten aus der Literatur für MDCK-Zellen [21, 48, 78], was auf eine hohe Desaminierungsaktivität in MDCK-Zellen unter den untersuchten Bedingungen hindeutet. Zu erwähnen ist hier allerdings, dass die thermisch bedingte, rein chemische Abspaltung von Ammonium von Glutamin vernachlässigt wurde.

Konzentrationsverläufe intrazellulärer Metaboliten – Glykolyse

Als erstes intrazelluläres Zwischenprodukt der Glykolyse wurde G6P in seinem Konzentrationsverlauf verfolgt (s. Abbildung 5-19). Im Gegensatz zu den extrazellulären Metaboliten zeigte sich, dass die intrazellulär gemessenen Werte einen deutlich größeren Schwankungsbereich aufwiesen. Grundsätzlich waren dennoch klare Tendenzen zu erkennen. Für beide Medien war zu Beginn der Kultivierung ein deutlicher, kurzer Anstieg der intrazellulären Konzentration zu erkennen, wobei

nach ca. 24 h (GMEM-Z) bzw. 14 h (EpiSerf) ein Maximum erreicht wurde. Anschließend wurde ein klarer Abfall der Konzentrationen gemessen, der bis ca. 60 h dauerte. In der Folge blieb die Konzentration relativ konstant bei ca. 10 µM. Die Konzentration des in der Glykolyse folgenden Metaboliten F6P beschreibt einen ähnlichen Verlauf wie G6P, allerdings lagen die gemessenen Konzentrationen für F6P geringfügig unter denen für G6P. Die Verläufe der Konzentration von F6P in beiden Medien stimmten qualitativ gut überein, wenn auch die Konzentrationen für EpiSerf zu Beginn der Kultivierung minimal über denen in GMEM-Z zu liegen schienen. Nach etwa 14 h wurden Konzentrationsmaxima für F6P erreicht und nach ca. 48 h war der darauf folgende Konzentrationsabfall beendet. Danach pendelten sich die Konzentrationen bei etwa 8 µM ein. Deutlich ist in diesem Diagramm zu erkennen, dass die Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Experimenten größer waren als zwischen den verschiedenen Medien. Kultivierung 3 zeigte im Maximum die höchsten Konzentrationen von etwa 70 µM, wohingegen für Kultivierung 1 eine maximale Konzentration von ca. 20 µM gemessen wurde. Der Konzentrationsverlauf von F16bP ähnelte wiederum den Verläufen der vorangehenden Metaboliten, allerdings waren die Konzentrationen deutlich höher als bei G6P und F6P. Im Maximum (für beide Medien bei ca. 14 h) wurde für die Kultivierung in GMEM-Z ein Wert von etwa 1700 µM (GMEM-Z3) gemessen und für EpiSerf von 1100 µM (EpiSerf1). Nach dem Erreichen des Maximalwertes folgte ein Abfall der Konzentrationen auf ca. 250 µM (GMEM-Z) bzw. ca. 50 µM (EpiSerf) nach etwa 70 h. Der im Schema der Glykolyse nächste gemessene Metabolit war 3PG. Grundsätzlich waren sich die Konzentrationsverläufe in beiden Medien wiederum sehr ähnlich und beschrieben, so wie die Stoffwechselintermediate vorher, einen anfänglichen Anstieg der Konzentration und danach einen Abfall. Allerdings wurde das Maximum für beide Medien (ca. 120 µM) deutlich später erreicht (ca. 46 h) als bei den Vorläufermetaboliten. Der Konzentrationsabfall war für beide Medien etwa nach 78 h abgeschlossen. In beiden Medien war die Konzentration von 3PG zu diesem Zeitpunkt bei etwa 50 µM. Während die Konzentration in GMEM-Z im weiteren Verlauf konstant erschien, fand in EpiSerf ein weiterer, leichter Abfall der Konzentration statt. Nach 198 h war die Konzentration auf etwa 30 µM abgesunken. Die Konzentrationen von PEP zeigten eindeutig unterschiedliche Verläufe verglichen mit vorangehenden Metaboliten. Zwar fand zu Beginn der Kultivierung in beiden Medien ein Konzentrationsanstieg statt, allerdings wurde das Maximum (GMEM-Z: 18 µM; EpiSerf: 30 µM) erst nach 60-70 h erreicht und insbesondere bei GMEM-Z folgte daraufhin ein minimaler Abfall der Konzentration. Ein Wert von etwa 15 µM lag zum Ende der Kultivierung vor. Für die Kultivierung in EpiSerf folgte nach dem Erreichen des Maximums ein steter Abfall der Konzentration bis auf einen Wert von etwa 10 µM. Somit ist PEP ein Metabolit, der für die beiden Medien sowohl im Verlauf als auch in den Konzentrationen klare Unterschiede zeigte. Noch deutlichere Unterschiede in Abhängigkeit vom Medium wurden für die Konzentrationsverläufe für Pyruvat beobachtet. Während sich die Konzentration von Pyruvat in GMEM-Z sehr ähnlich wie die Konzentration von PEP verhielt, unterschied sich die Pyruvatkonzentration bei Kultivierung mit EpiSerf deutlich vom Verlauf der PEP Konzentration. Hier fand von Beginn an bis ca. 78 h ein Abfall der Konzentration (von ca. 1000 µM bis ca. 400 µM) statt. Danach blieb die Konzentration

konstant. Für die Kultivierung in GMEM-Z hingegen stieg die Pyruvatkonzentration von ca. 300 µM bis auf 600 µM bis 70 h an. Im Anschluss war ein leichter Abfall bis auf etwa 500 µM zu verzeichnen. Pyruvat wird in MDCK-Zellen typischerweise fast vollständig zu Lactat reduziert und anschließend ausgeschieden.

Konzentrationsverläufe intrazellulärer Metaboliten – Krebszyklus

In einem alternativen Weg zur Ausscheidung von Lactat kann Pyruvat in den Krebszyklus eingeschleust werden. Dies kann z. B. nach Decarboxylierung des Pyruvats in Form von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) erfolgen. Dabei werden durch die Citrat-Synthase aus Acetyl-CoA und Oxalacetat Citrat gebildet. Die intrazelluläre Konzentration von Citrat sank nach Beginn der Kultivierung von ca. 1500 µM auf etwa 250 µM nach 92 h für EpiSerf und von ca. 1000 µM auf etwa 500 µM nach 48 h für GMEM-Z. Danach fanden für beide Medien keine merklichen Änderungen der Citratkonzentration statt. Ein qualitativ nahezu identisches Verhalten zeigten die Konzentrationsverläufe für *cis*-Aconitat und Isocitrat. Quantitativ war zu erkennen, dass für diese drei Intermediate die Anfangskonzentration für EpiSerf höher und die Endkonzentration niedriger waren als zu gleichen Zeitpunkten in GMEM-Z.

Der im Krebszyklus auf Isocitrat folgende Metabolit ist α-Ketoglutarat. Die Konzentrationsverläufe dieses Intermediates waren relativ stark unterschiedlich für die einzelnen Versuche. Zwar stimmten die Verläufe für die jeweils gleichen Bedingungen zu Beginn der Kultivierungen gut überein, allerdings ist ab etwa 70 h eine deutliche Diskrepanz zwischen den Versuchen 1 und 2 und dem Versuch 3 zu erkennen. Im dritten Versuch wurden erheblich höhere Konzentrationen ab 70 h gemessen als in den vorangegangenen Experimenten 1 und 2. Grundsätzliche Unterschiede zwischen den beiden Medien zeigten sich in den ersten 48 h der Kultivierung, wobei hier die Konzentration von α-Ketoglutarat für EpiSerf höher (500 µM) lag als für GMEM-Z (200 µM). Während in diesem Zeitraum die Konzentration für die Kultivierung in EpiSerf einen leichten Anstieg bis zu einem Maximum bei etwa 32 h zeigte, fand in GMEM-Z ein deutlich stärker ausgeprägter Anstieg statt, der sein Maximum (500 µM) bei etwa 60 h erreichte. Nach den Maxima sanken beide Konzentrationsverläufe in ähnlicher Form ab. Eine konkrete Endkonzentration für die beiden Medien zu nennen, fällt aufgrund der schon oben erwähnten starken Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchen schwer. So lagen die gemessenen Konzentrationen bei etwa 100 h für GMEM-Z zwischen etwa 230 und 500 µM und für EpiSerf zwischen 170 und 530 µM.

Der nächste aus dem Krebszyklus gemessene Metabolit ist Succinat. Hier zeigten sich für die beiden unterschiedlichen Medien klare, in allen Versuchen auftretende Unterschiede. Tendenziell war bei beiden Medien die Konzentration von Succinat zu Beginn der Kultivierung am höchsten, hielt in den ersten 48 h ein konstantes Niveau und fiel anschließend innerhalb kurzer Zeit (bis 78 h) auf einen Wert, der bis zum Ende der Kultivierung gehalten wurde. In GMEM-Z war allerdings noch ein leichtes Peak-Verhalten kurz vor dem Beginn des Konzentrationsabfalls (bei ca. 48 h) zu erkennen. Darüber hinaus war der Abfall in GMEM-Z deutlich steiler.

Für Fumarat wurde in EpiSerf zu Beginn der Kultivierung eine erheblich höhere Konzentration als für GMEM-Z gemessen. Anschließend zeigte der Verlauf für beide Medien ein Maximum (130 µM) bei etwa 46 h. Im Anschluss fiel die Konzentration ab, wobei GMEM-Z sich bei etwa 70 h auf einen Wert von ca. 60 µM einpendelte und bis zum Ende der Kultivierung konstant blieb. Für EpiSerf war ein längeres Abfallen der Konzentration (bis 90 h auf 45 µM) zu verzeichnen, wobei hier im weiteren Verlauf deutliche Schwankungen der Werte zu verzeichnen waren. Einen sehr ähnlichen Verlauf wie Fumarat zeigte die Konzentration von Malat, allerdings waren die Werte deutlich höher. Im Maximum bei ca. 46 h lagen die Werte bei ca. 900 µM für beide Medien. Nach dem Abfall der Konzentrationen waren die Werte etwa 400 µM (GMEM-Z) bzw. 200 µM (EpiSerf).

Konzentrationsverläufe intrazellulärer Metaboliten – Nukleotide

Neben den Metaboliten des zentralen Kohlenstoffstoffwechsels (Glykolyse, Krebszyklus) können durch die oben beschriebene Analysemethode auch diverse Nukleotide und Zuckernukleotide bestimmt werden. Abbildung 5-20 zeigt die Verläufe einiger ausgewählter Metaboliten und der Energy Charge.

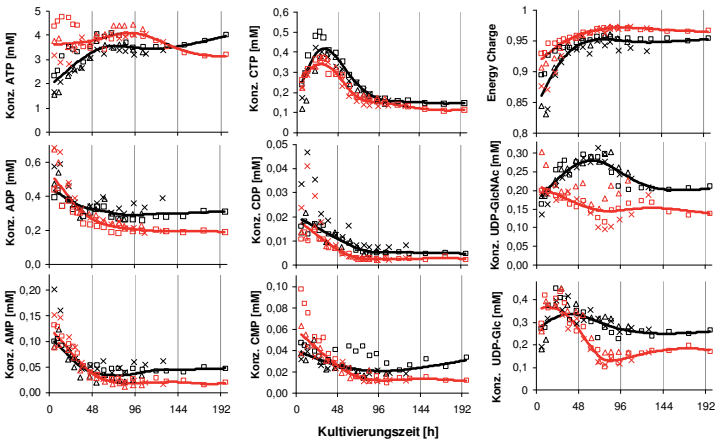


Abbildung 5-20: Verläufe der intrazellulären Konzentrationen ausgewählter Nukleotide und der Energy Charge bei Kultivierung von MDCK-Zellen in GMEM-Z (schwarz) und EpiSerf (rot).
Drei unabhängige Experimente wurden in Sechs-Well Platten durchgeführt (verschiedene Symbole, s. Abbildung 5-18). Für eine weitere, detaillierte Erklärung sei auf Abbildung 5-19 verwiesen.

Die Konzentration von ATP zeigte für die beiden Medien leicht unterschiedliche Verläufe, wobei die Konzentration in GMEM-Z insbesondere zu Beginn, aber auch sonst über weite Bereiche der Kultivierung unter der Konzentration in den Zellen in EpiSerf lag. Allerdings war gerade am Anfang der Kultivierungen für EpiSerf ein großer Schwankungsbereich für die drei einzelnen Versuche zu finden, d. h. innerhalb der ersten 24 h wurden Konzentrationswerte von etwa 3000 bis 4500 µM gemessen. Somit ist der anfängliche Verlauf der ATP-Konzentration in EpiSerf schwer zu

interpretieren. Trotzdem scheint im Durchschnitt ein leichter Anstieg der Konzentration bis etwa 80 h (auf ca. 4200 µM) und im Anschluss ein Abfall auf etwa 3200 µM zum Ende der Kultivierungen stattgefunden zu haben. Für die Kultivierung in GMEM-Z zeigte sich zu Beginn ein klarer Anstieg der ATP-Konzentration von etwa 2000 µM auf etwa 3500 µM bei etwa 78 h. Daraufhin folgte ein relativ konstanter Konzentrationsverlauf. Als weiteres Triphosphonukleosid ist in Abbildung 5-20 CTP dargestellt. Der Konzentrationsverlauf von CTP unterschied sich deutlich von ATP und war für beide Medien relativ ähnlich. Nach einem anfänglichen Anstieg bis etwa 30 h wurde ein Maximum (GMEM-Z: 450 µM; EpiSerf: 350 µM) erreicht. In den folgenden 40-50 h schloss sich ein Konzentrationsabfall bis auf einen Wert von 150 µM an. Diese Konzentration war bis zum Ende der Kultivierungsdauer für beide Medien relativ konstant. Die Verläufe von ADP, CDP, AMP und CMP ähnelten einander qualitativ sehr. Der Anfangswert war tendenziell am höchsten und es folgte ein Konzentrationsabfall bis etwa 70 h, wonach ein konstantes Konzentrationsniveau gehalten wurde. Grundsätzlich lagen die Anfangskonzentrationen dieser Metaboliten für EpiSerf über denen von GMEM-Z mit Ausnahme von CDP. Dem entgegen lagen die Endkonzentrationen für EpiSerf für alle diese Metaboliten unter denen von GMEM-Z. Quantitativ war bei diesen vier Metaboliten ADP mit einer Anfangskonzentration von ca. 600 µM am höchsten konzentriert, gefolgt von AMP (150 µM). CDP (30 µM) und CMP (60 µM) lagen in einem ähnlichen Konzentrationsbereich.

Sehr deutliche Unterschiede für die beiden Medien – sowohl qualitativ im Verlauf als auch quantitativ – zeigten die Metaboliten UDP-GlcNAc und UDP-Glc. Die Konzentration von UDP-GlcNAc stieg in GMEM-Z von Beginn der Kultivierung bis zu einem Maximum (300 µM) bei 60 h an. Anschließend fiel die Konzentration auf etwa 190 µM bis 130 h. Danach blieb der Wert nahezu konstant. In EpiSerf hingegen fiel die Konzentration von einem Anfangswert von etwa 220 µM innerhalb der ersten 70 h der Kultivierung auf einen Wert von etwa 150 µM ab und blieb bis zum Ende der Kultivierung nahezu konstant. Die gemessenen Konzentrationen waren für die Kultivierungen in GMEM-Z in einer schmaleren Bandbreite als für die Kultivierungen in EpiSerf, für welche z. B. bei etwa 70-80 h je nach Versuch 100-210 µM zu messen waren.

Die Konzentration von UDP-Glc beschrieb in EpiSerf einen ähnlichen Verlauf wie UDP-GlcNAc, wenn auch ein scheinbar stärker ausgeprägtes Verhalten vorlag. Nach etwa 20 h bei einer konstanten Konzentration (400 µM) sank der Wert bis ca. 80 h auf einen Wert von etwa 150 µM. Danach schloss sich ein Bereich mit nahezu konstanter Konzentration an. Hiervon deutlich abweichend war das Verhalten von UDP-Glc in GMEM-Z. In den ersten 24 h der Kultivierung stieg die Konzentration von etwa 250 µM auf ca. 400 µM an. Nach diesem Maximum fiel der Wert auf etwa die Anfangskonzentration bis 130 h ab, wonach sich ein konstantes Verhalten anschloss.

Diskussion

Ziel dieses Versuchs war, den Einfluss des Zellkulturmediums auf die intrazellulären Metabolitkonzentrationen aufzuklären. Hierbei sollte ein gutes Zellwachstum gewährleistet sein, um für Bioprozesse relevante Daten zu generieren. Zusätzlich sollte der zeitliche Verlauf der Metabolitkon-

zentrationen aufgenommen werden, um das Spektrum der physiologisch normalen Konzentrationen aufzudecken. Insbesondere für einen Vergleich mit Literaturwerten, wobei die genauen Kultivierungszustände nicht immer vollständig nachzuvollziehen sind, ist es erforderlich zu wissen, in welchem Bereich sich die Metabolitkonzentrationen unter normalen Bedingungen bewegen können.

Bei Betrachtung der intrazellulär gemessenen Metabolitkonzentrationen fällt auf, dass die mehrfach bestimmten Werte deutlich stärker schwankten (s. Abbildung 5-19) als dies für die extrazellulären Metaboliten der Fall ist. Zu erklären ist dies mit der erheblich aufwendigeren Probenvorbereitung bzw. mit der Messmethode. Wie in Abschnitt 5.2.5 gezeigt, lagen die relativen Standardabweichungen für die Messungen gemäß der etablierten Methode mit dem MS-Detektor bei etwa 12%. Auch für die anderen Detektoren ist mit einer relativen Standardabweichung von 7% zu rechnen. Eine weitere Erklärung kann auch die biologische Varianz zwischen den einzelnen Versuchen sein. Zwar ist die biologische Varianz innerhalb eines Experiments bei der Abschätzung der Standardabweichung berücksichtigt, aber für unabhängig voneinander durchgeführte Experimente kann keine Aussage zu den biologischen Schwankungen gegeben werden. Diese Schwankungen schlugen sich auch in den extrazellulären Messgrößen nieder, allerdings ist ganz offensichtlich die Geschwindigkeit der intrazellulären Konzentrationsänderungen deutlich höher, so dass sich geringe Unterschiede in z. B. der Einsaatzelldichte oder der Vorkultur stärker auswirken können. Unabhängig von den Schwankungen zwischen den einzelnen Messwerten waren klare Tendenzen der Konzentrationsverläufe zu erkennen. Ein qualitativ ähnlicher Konzentrationsverlauf zeigte sich für viele intrazelluläre Metaboliten unabhängig vom Medium, in sofern als dass drei Phasen durchlaufen wurden. Zu Beginn der Kultivierung lag eine hohe Konzentration vor. Anschließend fand ein Abfall statt und daran schloss sich eine Phase, in welcher eine relativ konstante Konzentration bis zum Ende der Versuche gehalten wurde. Unterschiede zwischen den Metaboliten und den Medien bestand in der unterschiedlichen Dauer dieser drei Phasen. Grundsätzlich war dieses einheitliche Verhalten bereits durch die Kreuzkorrelationsanalyse aller mit MDCK-Zellen durchgeführten Kultivierungen (Abbildung 5-16) zu erkennen, was sich in den überwiegend positiven Korrelationskoeffizienten widerspiegelte. Generell könnte als Erklärung für das dreiphasige Verhalten der Konzentrationen ein Zusammenhang zu den typischen Wachstumsphasen von adhärenten Zellen (s. Abbildung 3-1) erwähnt werden. So wird normalerweise in die drei oben erwähnten Phasen (Lag-, Exp- und Stat-Phase) eingeteilt. Wie aber aus der Abbildung deutlich wird, existieren weitere Wachstumsphasen, insbesondere der Übergang von exponentiellem Wachstum zur stationären Phase, und eine klare Zuordnung ist oft schwierig. Darüber hinaus traten die drei Phasen der Metabolitkonzentrationen nicht synchron auf, sondern unterschieden sich in ihren zeitlichen Abläufen mitunter deutlich (vgl. z. B. F16bP und Malat, Abbildung 5-19). Eine klare Interpretation der Konzentrationsverläufe im Zusammenhang mit den Wachstumsphasen erscheint somit nicht möglich.

Intermediate der Glykolyse

Bei Betrachtung der Konzentrationsverläufe der Intermediate aus der Glykolyse fällt auf, dass die ersten drei Metaboliten, G6P, F6P und F16bP, ein sehr ähnliches Muster aufwiesen, unabhängig

vom Medium. Während F6P und F16bP nahezu vollständig synchron für beide Medien verliefen, schien bei G6P zwar in EpiSerf der zeitliche Verlauf gut mit den anderen beiden Hexosephosphaten übereinzustimmen, allerdings war in GMEM-Z das Konzentrationsmaximum deutlich verzögert. Ob die extrazelluläre Konzentration von Glucose als Ursache hierfür in Frage kommt, konnte basierend auf diesen Ergebnissen nicht geklärt werden. Interessant ist, dass die erheblichen Unterschiede der extrazellulären Glucosekonzentration nur geringe Auswirkungen auf die intrazellulären Konzentrationen der ersten drei Glykolyseintermediate hatten. Zwar schien ein Konzentrationsunterschied von F6P für die beiden Medien zu existieren, allerdings waren die Werte für die einzelnen Kultivierungen stark unterschiedlich, weshalb hier nicht von Signifikanz ausgegangen werden kann. Im Falle von F16bP waren die Konzentrationsunterschiede deutlicher. Wie auch für F6P liegt die Vermutung nahe, dass hier ein Zusammenhang mit der extrazellulären Glucosekonzentration bestand. Während die beiden vorangehenden Metaboliten G6P und F6P gegen Ende für beide Medien gleiche Konzentrationen zeigten, lagen für F16bP in GMEM-Z bis zum Ende der Versuche die Werte deutlich über denen in EpiSerf. Dies deutet darauf hin, dass die Konzentrationen von G6P und F6P gegen Ende der Kultivierungen nicht von der extrazellulären Glucosekonzentration beeinflusst war, während dies bei F16bP der Fall zu sein schien.

Für 3PG wurde in den ersten 100 h ein nahezu identisches Verhalten für beide Medien gemessen, aber in der verbleibenden Zeit der Kultivierung sank die Konzentration von 3PG in Episerf deutlich unter die von GMEM-Z. Dies könnte einen Zusammenhang mit dem Konzentrationsverlauf von F16bP andeuten.

Der Verlauf von PEP zeigte deutliche Unterschiede für die beiden Medien. Bei etwa 60-70 h trat für beide Medien ein Maximum der Konzentration auf, wobei dieses Maximum für die Kultur in EpiSerf erheblich deutlicher ausgeprägt war. Der Zeitraum entspricht relativ genau der Phase der Kultur, in welcher die Konzentration von F16bP sein Minimum erreichte. Somit kommt an dieser Stelle eine metabolische Regulation in Frage. Die Aktivierung der Pyruvat-Kinase durch F16bP könnte zu diesem Zeitpunkt weggefallen sein, was zu einer Akkumulation von PEP geführt haben könnte. Die Tatsache, dass in GMEM-Z keine solch niedrigen Konzentrationen für F16bP wie in EpiSerf erreicht wurden und dem entsprechend auch die Akkumulation von PEP nicht so drastisch ausfiel, unterstreicht diese Hypothese.

Erhebliche Unterschiede in den Konzentrationsverläufen in Abhängigkeit vom Medium zeigten sich für Pyruvat. Grundsätzlich kann Pyruvat eine ganze Reihe von Reaktionen im Stoffwechsel durchlaufen. Typisch für kultivierte tierische Zellen wäre die Reduktion zu Lactat und anschließender Ausscheidung. Die Akkumulation von Lactat war für die beiden Medien unterschiedlich. Zum einen war die Endkonzentration von Lactat in GMEM-Z deutlich höher und zum anderen war auch die zellspezifische Lactatausscheidungsrate (nicht gezeigt) in GMEM-Z höher. Somit könnte die intrazelluläre Pyruvatkonzentration einen Hinweis auf den Lactatstoffwechsel geben. Grund hierfür könnte eine durch das Medium beeinträchtigte Aktivität der Lactat-Dehydrogenase gewesen sein. Allerdings widerspricht die in der Literatur erwähnte hohe Aktivität dieses Enzyms für verschiedenste Zustände dieser Hypothese [45, 58, 59, 65, 68, 223]. Auf Grund der nahezu generell hohen

Aktivität dieses Enzyms in kultivierten tierischen Zellen [40] wurden in der Vergangenheit die intrazellulären Konzentrationen von Pyruvat und Lactat genutzt, um das Verhältnis $[NAD^+] / [NADH + H^+]$ abzuschätzen [223]. Hierbei wurde bei dieser Reaktion von einem Gleichgewicht gemäß $K = ([Pyruvat][NADH + H^+]) / ([Lactat][NAD^+])$ ausgegangen. Somit ist das Verhältnis $[NAD^+] / [NADH + H^+]$ entscheidend für die Umsetzung von Pyruvat zu Lactat. Möglicherweise war dieses Verhältnis in EpiSerf höher, weshalb auch eine höhere Konzentration von Pyruvat zu Beginn der Kultivierung vorlag. Ein möglicher Beleg für diese Hypothese ist die niedrigere gemessene zellspezifische Lactatausscheidungsrate für die Kultur in EpiSerf-Medium.

Intermediate des Krebszyklus

Die Metaboliten Citrat, *cis*-Aconitat und Isocitrat zeigten in beiden Medien ein vergleichbares Verhalten. Interessanter Weise war der Konzentrationsabfall dieser Metaboliten im EpiSerf-Medium größer als in GMEM-Z und dieser Abfall zog sich auch über einen längeren Zeitraum hin. Auffallend für EpiSerf war, dass eine hohe Übereinstimmung der Konzentrationsverläufe dieser Metaboliten mit dem von Pyruvat bestand. Ob diese Übereinstimmung mit einem größeren Fluss von Pyruvat in den Krebszyklus bzw. einer gemeinsamen Regulation dieser Metaboliten erklärt werden kann, bliebe in weiteren Versuchen zu klären. Ebenso eine hohe Ähnlichkeit in den Verlaufskurven bestand für Citrat, *cis*-Aconitat und Isocitrat mit der extrazellulären Glutaminkonzentration für beide Medien. Möglicherweise deutet dies einen regulatorischen Zusammenhang an. Die Konzentrationen von α-Ketoglutarat und Succinat zeigten wiederum für beide Medien qualitativ ähnliche Verläufe. Interessant sind die Konzentrationsverhältnisse dieser Metaboliten in der Anfangsphase in den beiden Medien. Während die Konzentration von α-Ketoglutarat in EpiSerf über der in GMEM-Z lag, war die Konzentration von Succinat in GMEM-Z höher als in EpiSerf. Diese Abhängigkeit dieses Konzentrationsverhältnisses deutet einen durch das Medium bedingten regulatorischen Effekt an. Ebenso war scheinbar die Reaktion von Succinat zu Fumarat durch die beiden Medien unterschiedlich beeinflusst, da gerade bis 48 h die Verhältnisse der Konzentrationen in den Medien verschieden waren. Zum Ende der Kultivierungen lag aber für Succinat und Fumarat die Konzentration in EpiSerf deutlich unter der in GMEM-Z. Ein möglicher Einfluss an dieser Stelle könnte das Redoxverhältnis FAD/FADH gespielt haben. Dadurch könnte bei dieser Reaktion das Konzentrationsgleichgewicht von Succinat zu Fumarat verschoben worden sein.

Malat zeigte einen vergleichbaren Konzentrationsverlauf wie Fumarat. Ein identisches Verhalten dieser beiden Metaboliten wurde auch in der Korrelationsanalyse für alle Experimente (Abbildung 5-15) gefunden. Wie bereits oben bemerkt, ist die durch die Fumarase katalysierte Reaktion scheinbar sehr aktiv und wahrscheinlich ständig im Gleichgewicht [295].

Nukleotide

Die gezeigten Konzentrationen von Nukleotiden und Zuckernukleotiden (Abbildung 5-20) wiesen zum Teil sehr ähnliche, aber auch mitunter deutlich unterschiedliche Verläufe auf. Im Bezug auf medienbedingte Unterschiede ist besonders ATP zu nennen. Zwar sind die exakten Verläufe zu Beginn der Kultivierungen durch die vergleichsweise breite Streuung schwer zu beurteilen. Die

dennoch deutlich höhere Konzentration in Episerf innerhalb der ersten etwa 100 h ist jedoch offensichtlich. Grundsätzlich waren die Verläufe ab ca. 48 h relativ konstant für beide Medien. Da ab etwa 120 h nur für Kultivierung 3 Proben genommen wurden, sollte in weiteren Experimenten geprüft werden, ob die Konzentration von ATP in Episerf gegen Ende der Kultivierung tatsächlich signifikant niedriger war. Für ADP und AMP schienen die Konzentrationen ab etwa 48 h in Episerf deutlich niedriger zu sein als für GMEM-Z. Diese drei Adenosinnukleotide fließen in die Berechnung der *Energy Charge* ein. Aus den beschriebenen Konzentrationen ergibt sich zwangsläufig ein höherer Wert für EpiSerf als für GMEM-Z. In der Vergangenheit zeigten zahlreiche Arbeiten *in vitro* den regulatorischen Einfluss der Adenosinnukleotide auf verschiedenen Enzyme [89, 93, 94, 283]. In diesen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass schon geringe Änderungen der *Energy Charge* einen Einfluss auf die Aktivitäten vieler Enzyme haben können. Insbesondere einige Enzyme der Glykolyse und des Krebszyklus werden durch eine hohe *Energy Charge* inhibiert [94]. Somit könnte die höhere *Energy Charge* der in EpiSerf kultivierten Zellen den etwas langsameren Abbau der Glucose erklären. Die Zusammenhänge *in vivo* sind allerdings deutlich komplexer als bei den oben erwähnten Untersuchungen zu Enzymaktivitäten *in vitro*, da der vollständige Metabolismus berücksichtigt werden muss. Grundsätzlich muss bei den Kultivierungsversuchen die Ursache des unterschiedlichen Stoffwechsels in den Kultivierungsbedingungen liegen. Somit sind die verschiedenen Medien die Ursache für die unterschiedliche *Energy Charge*. Wie groß der regulatorische Einfluss in der Folge ist, kann basierend auf den hier gewonnenen Daten nur schwer beurteilt werden. Für Cytidinnukleotide zeigte der Vergleich der beiden Medien keine deutlichen Tendenzen, was darauf schließen lässt, dass diese Metaboliten nur vergleichsweise schwach vom Medium beeinflusst waren.

Die beiden in Abbildung 5-20 dargestellten Zuckernukleotide wiesen stark vom Medium beeinflusste Konzentrationsverläufe auf. Grund hierfür könnte die unterschiedliche Ammoniumkonzentration im Zellkulturüberstand der beiden Medien gewesen sein. Ein solcher Zusammenhang ist aus der Literatur bekannt [95, 96]. Des Weiteren wurde von Ryll und Wagner [96] gezeigt, dass die Konzentration von Glucose im Medium relevant für den Ammonium bedingten Anstieg der Zuckernukleotide ist.

Bei Betrachtung der Verläufe der intrazellulären Metaboliten stellt sich die Frage nach dem Verhalten der Konzentrationen in den ersten sechs Stunden nach Inokulation. Dabei ist zu berücksichtigen, in welchem metabolischen Zustand die Vorkultur war. Da von der Vorkultur keine Probe der intrazellulären Metaboliten genommen wurde, kann keine direkte Aussage getroffen werden. Allerdings war die Vorkultur vier Tage alt und da diese Kultur auch statisch (bzw. in Rollerflaschen) war, kann davon ausgegangen werden, dass ähnliche intrazelluläre Metabolitkonzentrationen vorlagen, wie nach 96 h in den gezeigten Versuchen mit GMEM-Z (gleiches Medium, vgl. Abbildung 5-19). Somit waren die Konzentrationen am Ende der Vorkultur tendenziell relativ niedrig (s. z. B. G6P, F6P, F16bP, Citrat, ADP, AMP, Abbildung 5-19). Vor der Einsaat in das neue Kultursystem wurde mit PBS gewaschen und anschließend trypsiniert. Da in diesem Zeitraum keine Versorgung mit Nähstoffen gegeben war, kann wahrscheinlich von einer weiteren Abnahme der

intrazellulären Konzentrationen ausgegangen werden. Um also die intrazellulären Konzentrationen, welche 6 h nach Inokulation gemessen wurden, erklären zu können, muss in dem Zeitraum nach Suspendierung der Zellen in neuem Zellkulturmedium bis zur Probenahme (bei 6 h) ein deutlicher Konzentrationsanstieg stattgefunden haben. Als Ursache hierfür kommt die enorme Umstellung der Kulturbedingungen in Frage. Dies bedeutet, dass die Zellen, welche in der Vorkultur nach vier Tagen typischerweise bereits stark wachstumsinhibiert waren, nach Umsetzung in das neue Kulturmedium und bei ausreichender Wachstumsoberfläche in den Zustand eines schnellen Zellwachstums übergingen. Auch die mitunter deutlichen Unterschiede im ersten Probenahmezeitpunkt zwischen den beiden Medien sind ein Indiz für die starken Änderungen der Konzentrationen in den ersten Stunden der Kultivierung, da dieselbe Vorkultur genutzt wurde.

Insgesamt konnten die Versuche mit den beiden stark unterschiedlichen Medien GMEM-Z und EpiSerf zeigen, dass die intrazellulären Konzentrationen zahlreicher Metaboliten erheblich durch das Zellkulturmedium beeinflusst waren, was ganz deutlich die Komplexität der Regulation des Zentralstoffwechsels andeutet.

Kreuzkorrelationsanalyse der Konzentrationen, Zellzahlen und Zellvolumina

Eine vollständige Beschreibung sämtlicher gemessener Stoffwechselproduktkonzentrationen ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Um allerdings das Verhalten der Konzentrationen zumindest qualitativ wiederzugeben und um einen besseren Überblick über die Ähnlichkeiten im Verlaufsverhalten zu erhalten, wurde eine Kreuzkorrelation der verschiedenen Verlaufskurven der Metaboliten durchgeführt. Zwar sind die Kreuzkorrelationsmatrizen in diesem Abschnitt nach den bereits gezeigten einzelnen Verläufen der Metabolitkonzentrationen aufgeführt, typischerweise wurden die Korrelationsmatrizen allerdings bei der Auswertung von Experimenten zuerst begutachtet um einen Überblick über die Gruppierungen der Konzentrationsverläufe zu erhalten. Anschließend wurden dann einzelne, charakteristische Verläufe begutachtet. Um ein besseres Verständnis zu erreichen, wurde die Reihenfolge dieser Abbildungen hier vertauscht.

Da sich die Konzentrationsverläufe mancher Metaboliten stark ähnelten, aber einen Zeitversatz aufwiesen, wurde ein gegenseitiges Verschieben der Kurven um bis zu 10 h zugelassen. Für eine detaillierte Beschreibung der Kreuzkorrelationsanalyse sei auf die Abschnitte 3.6 und 4.5 verwiesen. Neben den gemessenen intrazellulären Konzentrationen wurden einige extrazelluläre Metabolitkonzentrationen, die Zellzahl und das Gesamtzellvolumen in die Kreuzkorrelationsanalyse mit aufgenommen. Ein eventueller Zusammenhang zwischen diesen Größen und den intrazellulären Metabolitkonzentrationen sollte auf diese Weise aufgeklärt werden. Abbildung 5-21 zeigt das Ergebnis der entsprechenden Kreuzkorrelationsanalyse für die Kultivierung in GMEM-Z. Von den 38 Variablen, die für die Kreuzkorrelationsanalyse genutzt wurden, sind in Abbildung 5-18, Abbildung 5-19 und Abbildung 5-20 nur 29 in ihren Verläufen dargestellt, allerdings lässt sich die Korrelationsmatrix nutzen, um die Verläufe der verbleibenden Variablen zu erahnen. Z. B. ist R5P bei einem Zeitversatz von 5 h stark mit G6P positiv korreliert. Dies bedeutet, dass bei Verschiebung

des Konzentrationsverlaufs von R5P um 5 h zu späteren Zeitpunkten eine hohe Übereinstimmung mit dem Verlauf von G6P erreicht wird.

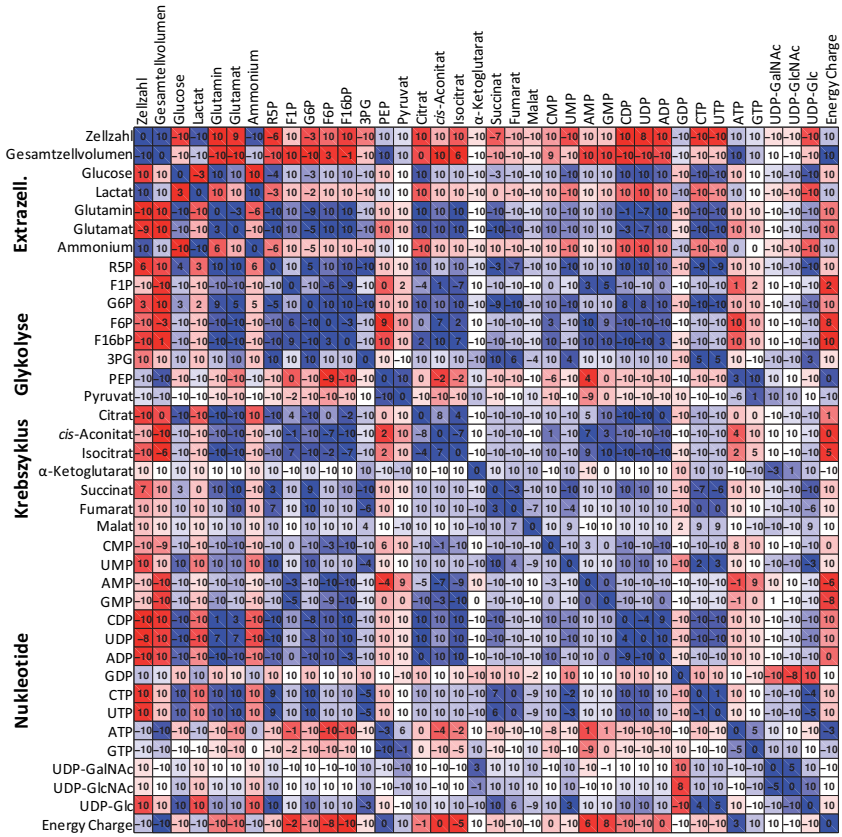


Abbildung 5-21: Kreuzkorrelationsmatrix für Kultivierungen von MDCK-Zellen in GMEM-Z.

Auf sowohl x- als auch y-Achse sind die Variablen aufgetragen, welche miteinander kreuzkorreliert wurden. Die Farben rot und blau deuten negative bzw. positive Korrelationen an, die Farbsättigung deutet entsprechend der unter Abbildung 5-15 aufgeführten Farbkodierung den Korrelationskoeffizienten r an; die Zahlen in den entsprechenden Feldern stehen für den zeitlichen Versatz τ [h]. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt, anschließend wurden die Daten der drei Experimente gemeinsam geglättet (Spline bzw. Boltzmann-Sigmoid; s. durchgezogene Verlaufskurven in Abbildung 5-19). Für eine weitere Erklärung zur Interpretation sei auf Abbildung 5-16 verwiesen.

Grundsätzlich zeigt die Matrix mehr positive Korrelationen als negative. Die bereits in Abbildung 5-19 gut korrelierenden Metabolitgruppen sind auch in diesem Diagramm wiederzufinden. Die starke Farbsättigung deutet eine große Anzahl von hohen Korrelationskoeffizienten an. Eine Gruppe stark positiv korrelierender Variablen bildete ein Großteil der extrazellulären Konzentrationen, einige Glykolyseintermediate, verschiedene organische Säuren und einige Nukleotide. Repräsentativ für diese Verläufe sind die gemessenen Zuckerphosphate, die zu Beginn eine hohe Konzentration, später einen Konzentrationsabfall und gegen Ende einen konstanten Wert zeigten. Die zu

diesen Metaboliten positiv korrelierten Variablen wiesen somit einen ähnlichen, wenn auch eventuell zeitversetzten Verlauf auf. Die mit den Zuckerphosphaten negativ korrelierten Variablen zeigten einen entgegengesetzten Konzentrationsverlauf, d. h. zuerst waren die Werte niedrig und im Verlauf der Kultivierung stiegen diese Werte an. Einige der stark negativ korrelierten Variablen waren z. B. die Zellzahl, das Gesamtzellvolumen, Lactat, Ammonium. Die hier erwähnten Korrelationen beinhalten offensichtliche bzw. bekannte Zusammenhänge wie z. B. Zellzahl und Gesamtvolumen und negative Korrelationen wie z. B. Glucose und Lactat. Aber auch eine ganze Reihe weiterer Korrelationen, die nicht offensichtlich sind. So korrelieren in diesem Block unter anderem CDP, UDP und ADP gut miteinander, allerdings sind diese Metaboliten negativ korreliert mit der Zellzahl bzw. dem Gesamtvolumen.

Die Metaboliten PEP und Pyruvat korrelierten fast ausschließlich stark miteinander. Zusätzlich zeigte vor allem PEP eine positive Korrelation zum Gesamtzellvolumen, ATP und GTP. Wie schon in Abbildung 5-19 zu erkennen war, verhielten sich die Konzentrationsverläufe von Citrat, *cis*-Aconitat und Isocitrat sehr ähnlich, was sich hier in einer hohen positiven Korrelation widerspiegelte. Für α-Ketoglutarat war kein Korrelationskoeffizient $< -0{,}6$ bzw. $> 0{,}6$. Succinat und Fumarat korrelierten gut miteinander, allerdings gab es noch einige andere Metaboliten, die mit diesen organischen Säuren korrelierten. Mit dem schon erwähnten Block der Diphosphonukleoside waren noch CTP und UTP korreliert. Eine positive, wenn auch moderate Korrelation war bei ATP und GTP zu erkennen. Stark positiv miteinander korreliert waren die beiden Zuckernukleotide UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc. UDP-Glc war mit diesen beiden Zuckernukleotiden ebenfalls positiv korreliert.

Bezüglich der zeitlichen Verschiebungen dieser Kreuzkorrelationsanalyse zeigte sich, dass z. B. der Verlauf der Zellzahl dem des Gesamtzellvolumens folgte. Für die Zuckerphosphate stellte sich heraus, dass ein positiver Zeitversatz in der Reihenfolge F1P, F6P, F16bP, G6P und R5P existierte. Dies bedeutet, dass die Konzentration von F1P den weiteren Zuckerphosphaten vorausging. Der Verlauf der Konzentration von Citrat folgte dem von *cis*-Aconitat und Isocitrat.

In Abbildung 5-22 ist das Ergebnis der Kreuzkorrelation für die Kultivierungen in EpiSerf dargestellt. Grundsätzlich traten viele Korrelationen auf, die auch für die Kultivierungen in GMEM-Z zu finden waren. Insbesondere der Block extrazellulärer Metaboliten und deren Änderungen zeigte in beiden Medien ein sehr ähnliches Muster. Eine Ausnahme bildeten Glutamin und Ammonium, die gering mit anderen Stoffwechselprodukten korreliert waren. In dem großen Block der stark korrelierenden Metaboliten waren die Gruppe von Zuckerphosphaten, die meisten organische Säuren aus dem Krebszyklus, und der Großteil der gemessenen Nukleotide mit Ausnahme von GDP, GTP und ATP. Wie bei diesen drei Nukleotiden wurden für 3PG, PEP und Malat nur geringe Korrelationen mit anderen Stoffwechselprodukten gefunden. Dennoch war Malat mit den organischen Säuren α-Ketoglutarat, Succinat und Fumarat korreliert.

Bei Betrachtung der zeitlichen Verschiebungen für die Kultivierungen mit EpiSerf fällt auf, dass z. B. der Anstieg im Verlauf der Zellzahl dem des Gesamtzellvolumens um 10 h folgte. Die

Korrelationen der Zellzahl mit Glucose (negativ) und Lactat (positiv) hatte ihr Optimum bei einer zeitlichen Verschiebung von -10 h. Weiterhin zu erwähnen ist, dass der Metabolit F1P vor den anderen Zuckerphosphaten den für diese Gruppe charakteristischen Verlauf durchlief, gefolgt von F6P, G6P, F16bP und R5P. Somit ging der Verlauf von G6P dem von F16bP voraus.

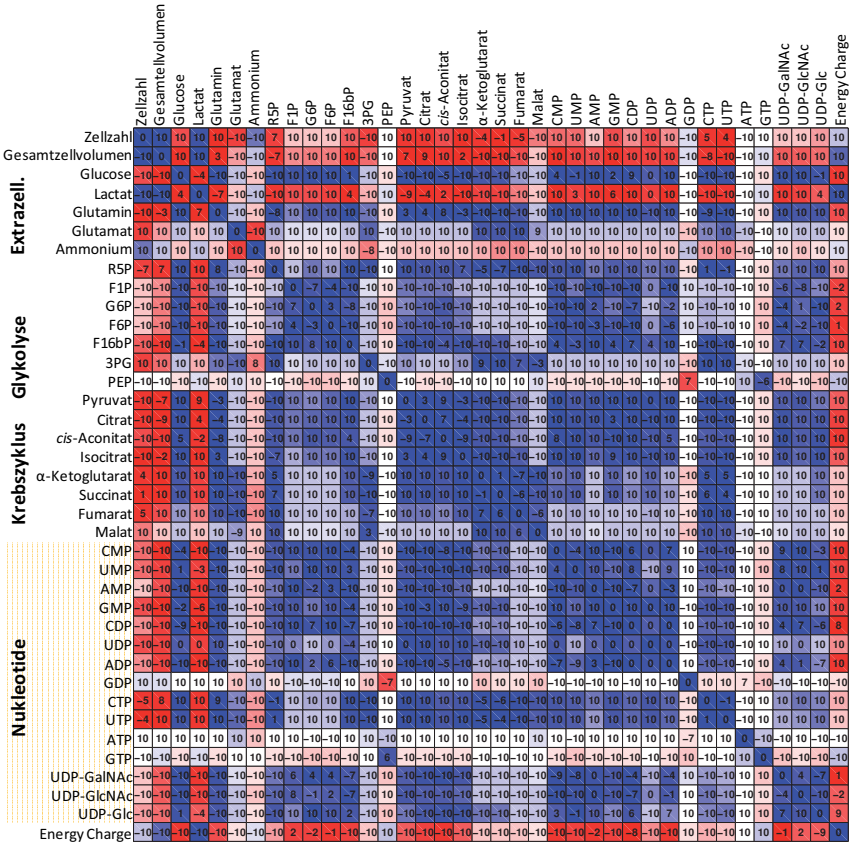


Abbildung 5-22: Kreuzkorrelationsmatrix für Kultivierungen von MDCK-Zellen in EpiSerf. Zur Erläuterung s. Abbildung 5-21.

Grundsätzlich zeigten sich somit in beiden Medien einige gemeinsame Korrelationen. Insbesondere die extrazellulären Konzentrationen, die Zellzahl und das Gesamtzellvolumen wiesen in beiden Medien übereinstimmende Muster auf. Weiterhin waren die Korrelationen im Block der Zuckerphosphate in beiden Medien ausgeprägt. Die organischen Säuren Citrat, *cis*-Aconitat und Isocitrat korrelierten ebenfalls in beiden Medien, sowie auch Succinat und Fumarat. Einen weiteren, in beiden Medien ausgeprägten Block, bildeten CDP, UDP und ADP sowie CTP und UTP. Auch die beiden Zuckernukleotide UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc waren in beiden Medien gut korreliert.

Um deutliche Unterschiede zwischen den beiden Medien klarer darstellen zu können, wurde von den Korrelationskoeffizienten der Kultivierungen in GMEM-Z die der Kultivierungen in EpiSerf subtrahiert. Diese Matrix (Abbildung 5-23) enthält keine Werte mit konkreter Bedeutung wie z. B. Korrelationskoeffizienten, verdeutlicht aber ganz klar, wo das Korrelationsverhalten zwischen Metaboliten in Abhängigkeit vom Medium stark verändert war.

Insbesondere für die extrazellulären Metaboliten, die Zellzahl und das Volumen, wie auch die Zuckerphosphate zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Medien. Besonders auffällige Differenzen waren für Pyruvat und ATP ist zu erkennen. Weniger offensichtlich waren die Unterschiede für die Metaboliten PEP, α-Ketoglutarat, GDP, GTP, UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc. Grundsätzlich spiegeln diese Unterschiede, die schon im Zusammenhang mit Abbildung 5-19 und Abbildung 5-20 bemerkten klaren Unterschiede in den Verläufen wider.

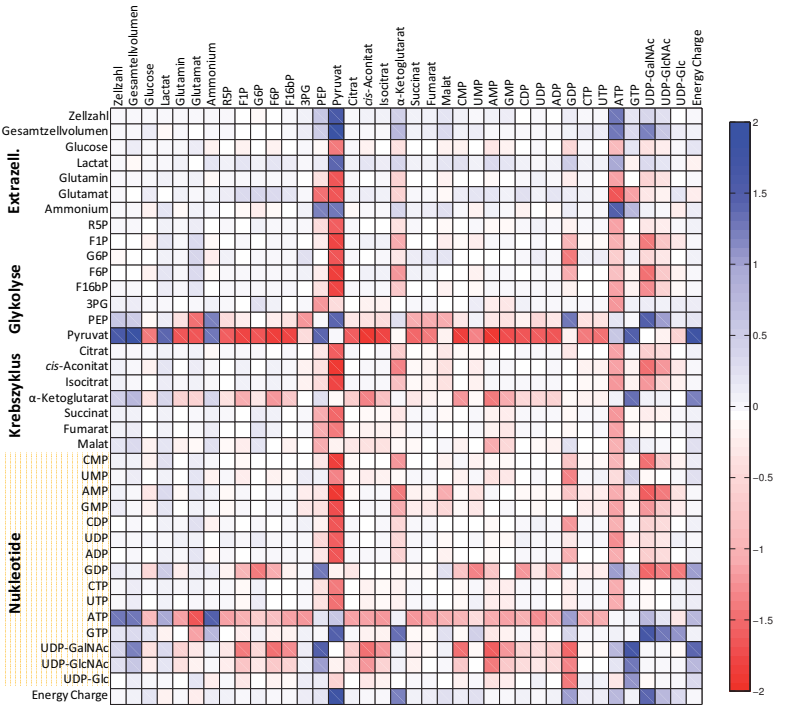


Abbildung 5-23: Darstellung der Differenzen der Korrelationen zwischen den Medien GMEM-Z und EpiSerf.

Für diese Matrix wurden die Korrelationskoeffizienten für EpiSerf (s. Abbildung 5-22) von denen für GMEM-Z (s. Abbildung 5-21) subtrahiert. Felder mit starker Farbsättigung deuten deutliche Unterschiede im Korrelationsverhalten zwischen den beiden Medien an.

Diskussion

Das grundlegende Problem bei der Interpretation der für die beiden Medien gezeigten Datensätze ist es, eine geeignete Form der Darstellung zu finden. Um Details im Konzentrationsverhalten eines Metaboliten zu erkennen, war die Auftragung der zeitlichen Verläufe eine gute Möglichkeit. Allerdings konnte auf diese Weise nur schwer ein Überblick über die Zusammenhänge zwischen verschiedenen Metaboliten und den weiteren Messgrößen erreicht werden. Wie bereits bei den weiter oben gezeigten Zusammenfassungen verschiedener Experimente erwies sich auch für den Medienvergleich die Kreuzkorrelationsanalyse als sehr gute Vorgehensweise, um einen Überblick über Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten bedingt durch das Medium zu erhalten.

Die gezeigten Kreuzkorrelationsmatrizen für die beiden Medien (Abbildung 5-21 und Abbildung 5-22) wiesen zahlreiche Übereinstimmungen auf. Grundsätzlich überwogen für beide Medien die positiven Korrelationen (blaue Färbung). Wie bereits oben erwähnt (s. Abschnitt 5.3.2.1), schien das gleichartige Verhalten dieser korrelierenden Metaboliten durch einen übergeordneten Parameter wie z. B. die Stoffwechselaktivität oder die Zellteilungsaktivität reguliert gewesen zu sein. Diese beiden Parameter sind typischerweise zu Beginn der Kultivierung hoch und am Ende niedrig.

Die für beide Medien gleichartig korrelierenden Metaboliten sind gut in Abbildung 5-23 zu erkennen. Ungefärbte Felder deuten Metabolitpaare an, welche in beiden Medien ein sehr ähnliches Korrelationsverhalten zeigten. Grundsätzlich zeichnete sich dieses gleichartige Korrelationsverhalten einiger Stoffwechselprodukte bereits in den zusammenfassenden Korrelationsmatrizen (Abbildung 5-15 und Abbildung 5-16) ab. Die dort nur gering korrelierenden Metaboliten, wie z. B. Pyruvat oder ATP wiesen auffälligen Differenzen zwischen den beiden Kultivierungen in GMEM-Z und EpiSerf (Abbildung 5-23) auf. Da dort somit ein unterschiedliches Verhalten auftrat, war ein uneinheitliches Verhalten bei der Zusammenfassung der Kultivierungen ein logischer Effekt.

Die Differenz der Kreuzkorrelationsanalysen der beiden Medien (Abbildung 5-23) lieferte einen deutlichen Überblick darüber, welche Metaboliten sich unterschiedlich verhielten. Wie schon oben beschrieben, schien Pyruvat ein Metabolit zu sein, der sich an einer regulatorischen Schlüsselstelle befindet. Erhebliche Unterschiede im Korrelationsverhalten traten für diesen Metabolit auf. Mögliche Erklärungen für dieses unterschiedliche Verhalten sind oben (S.125) gegeben. Auch für ATP, PEP, α-Ketoglutarat, GDP, GTP, UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc lag ein unterschiedliches Korrelationsverhalten für die beiden Medien vor. Bis auf GDP und UDP-GalNAc sind die einzelnen Konzentrationsverläufe für diese Metaboliten gezeigt (Abbildung 5-19 und Abbildung 5-20). Das Verhalten der Konzentration von UDP-GalNAc war direkt korreliert mit UDP-GlcNAc. Wie in Abbildung 5-15 zu sehen, war dies für den Großteil der Versuche der Fall. Mögliche Gründe für das vom Medium abhängige Konzentrationsverhalten der UDP aktivierten Aminohexosen sind auf Seite 127 gegeben. Der Verlauf der Konzentration von GDP zeigte nicht nur in den Versuchen mit GMEM-Z und EpiSerf niedrige Korrelationskoeffizienten (Abbildung 5-21 und Abbildung 5-22), sondern auch im Mittel für alle Kultivierungen mit MDCK-Zellen war das Konzentrationsverhalten von GDP nur schwach mit anderen Variablen korreliert (Abbildung 5-16). Charakteristisch für den Verlauf von GDP war, unabhängig vom Medium, dass der anfängliche Konzentrationsabfall in

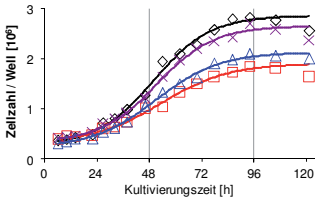
deutlich kürzerer Zeit (ca. 30 h) ausfiel, als für die weiteren Nukleosiddiphosphate (ca. 70 h). Im Anschluss war für die meisten Kultivierungen ein konstantes Konzentrationsniveau bzw. ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Das Beispiel von GDP deutet den eigentlichen Weg der Datenanalyse für die durchgeführten Experimente an. Zuerst wurde die Korrelationsanalyse genutzt, um eine Gruppierung der Konzentrationsverläufe zu ermöglichen bzw. einen generellen Überblick der Konzentrationsabläufe zu erhalten. Anschließend wurden die einzelnen Gruppen auf die eigentlichen Verläufe untersucht.

Beim Vergleich der beiden Medien bezüglich ihrer zeitlichen Verschiebungen sind einige Übereinstimmungen zu finden. Unter anderem folgte in beiden Medien der Verlauf der Zellzahl dem Gesamtzellvolumen um 10 h. Die Korrelationen der Zellzahl mit Glucose (negativ) und Lactat (positiv) hatten allerdings ihr Optimum bei einer zeitlichen Verschiebung von -10 h für EpiSerf im Gegensatz zu +10 h für GMEM-Z. Bei den Zuckerphosphaten zeigte sich wiederum ein ähnliches Bild bei den Verläufen für die beiden Medien. Allerdings durchlief der Metabolit F1P vor den anderen Zuckerphosphaten den für diese Gruppe charakteristischen Verlauf bei Kultivierung in EpiSerf. Weiterhin folgten F6P, G6P, F16bP und R5P. Somit ging, im Gegensatz zu GMEM-Z, der Verlauf von G6P dem von F16bP voraus.

5.3.2.3 Kultivierung in DMEM-Medium mit unterschiedlichen Substraten

Nachdem in Abschnitt 5.3.2.2 der Einfluss von zwei stark unterschiedlichen Medien auf die intrazellulären Metabolitkonzentrationen untersucht wurde, stellte sich die Frage, worauf diese Unterschiede im Detail zurückzuführen sind. Dazu wurden vier verschiedene Kultivierungen in einem Medium durchgeführt, welches sich jeweils in einer Komponente von den anderen unterschied. Das heißt, es wurde für alle Kultivierungen das Medium DMEM mit Pepton und FCS aber ohne Glucose und ohne Glutamin eingesetzt. Der Grund für die Wahl des Basismediums DMEM begründet sich mit der Tatsache, dass dieses Medium auch ohne Glucose zu akzeptablen Preisen bezogen werden konnte und normalerweise ein vergleichbares Zellwachstum wie in GMEM als Basismedium ermöglichte. Zusätzlich wurden zu den einzelnen Medien folgende Substrate zugegeben: 1: Glucose (2,5 mM) + Glutamin (2 mM); 2: Glucose (2,5 mM); 3: Glutamin (2 mM); 4: Pyruvat (2 mM). Auf diese Weise sollten die Effekte der verschiedenen extrazellulären Substrate auf die intrazellulären Metabolitpools überprüft werden. Abbildung 5-24 (A) zeigt die gemessenen Zellzahlverläufe. Deutlich zu erkennen sind die unterschiedlichen maximalen Zellzahlen in Abhängigkeit von den Wachstumssubstraten. Die Tabelle in Abbildung 5-24 (B) fasst die charakteristischen Daten zur Beschreibung der vier verschiedenen Kultivierungen zusammen.

(A)



(B)

Medium	Zellzahl/Well bei t = 0 h [10^6]	μ_{max} [1/h][a]	max. Zellzahl/Well [10^6] [b]
+Glc+Gln	0,46	0,039	2,72
+Glc	0,45	0,034	2,55
+Gln	0,47	0,036	2,05
+Pyr	0,50	0,026	1,77

[a] für den Zeitraum von 22 h – 54 h
[b] Mittelwert der letzten drei Probenahmezeitpunkte

Abbildung 5-24: Verläufe der Zellzahlen (A) und Zusammenfassung der Startzellzahlen, der maximalen spezifischen Wachstumsraten und maximalen Zellzahlen (B) bei Kultivierungen von MDCK-Zellen in DMEM mit vier verschiedenen Wachstumssubstraten.
Medium mit Glc (2,5 mM) und Gln (2 mM): ◊; Medium mit Glc (2,5 mM): ×; Medium mit Gln (2 mM): △; Medium mit Pyr (2 mM): □ .

Sowohl maximale spezifische Wachstumsrate als auch maximale Zellzahl waren in dem Medium mit Glucose und Glutamin am höchsten. Für die Kultivierungen mit den einzelnen Substraten Glucose und Glutamin waren die maximalen spezifischen Wachstumsraten nur gering unterschiedlich, wobei aber die maximalen erreichten maximalen Zellzahlen im glucosehaltigen Medium deutlich höher lagen als in dem Medium mit Glutamin. Die niedrigste maximale spezifische Wachstumsrate und maximale Zellzahl wurde in dem Medium mit Pyruvat erreicht.

In Abbildung 5-25 sind einige Verläufe extra- und intrazellulärer Metabolitkonzentrationen dargestellt. Am Verlauf von Glucose ist zu erkennen, dass dieses Substrat in den beiden glucosehaltigen Medien innerhalb von etwa 48 h verbraucht wurde. Der Verlauf nach 48 h wird weiter unten diskutiert. Der nächste dargestellte Verlauf zeigt die Konzentration von F16bP. Während die beiden Medien, welche Glucose enthielten, ein nahezu identisches quantitatives Verhalten aufwiesen, war auch für die beiden anderen Medien F16bP nachweisbar, wenn auch in deutlich niedrigeren Konzentrationen. Die beiden in der Glykolyse vorangehenden Metaboliten G6P und F6P zeigten qualitativ sehr ähnliche Konzentrationsverläufe, die Konzentrationen waren aber deutlich niedriger (nicht dargestellt). Für 3PG wurden schwer zu interpretierende Verläufe gemessen. Die geglätteten Verläufe deuteten auf der einen Seite ein ähnliches Verhalten für die beiden Medien mit Glucose und auf der anderen Seite für die beiden Medien ohne Glucose an. Der Verlauf der Konzentration von PEP ähnelte dem von 3PG sehr stark (nicht dargestellt). Der Konzentrationsverlauf von intrazellulärem Pyruvat zeigte für die drei Medien ohne Pyruvat nach einem anfänglichen Konzentrationsabfall einen leichten Anstieg über die verbleibende Dauer der Kultivierung. Das Medium mit Pyruvat wies einen deutlichen Abfall der intrazellulären Konzentration innerhalb von etwa 48 h, danach wurde ein relativ konstanter Wert in etwa auf dem Niveau der anderen Medien gemessen. Zusätzlich ist der Konzentrationsverlauf von extrazellulärem Pyruvat dargestellt. Nach anfänglicher relativ konstanter Konzentration folgte eine Phase mit höherer Pyruvataufnahme. Ab etwa 72 h ist die Konzentration von Pyruvat im Medium nahezu konstant.

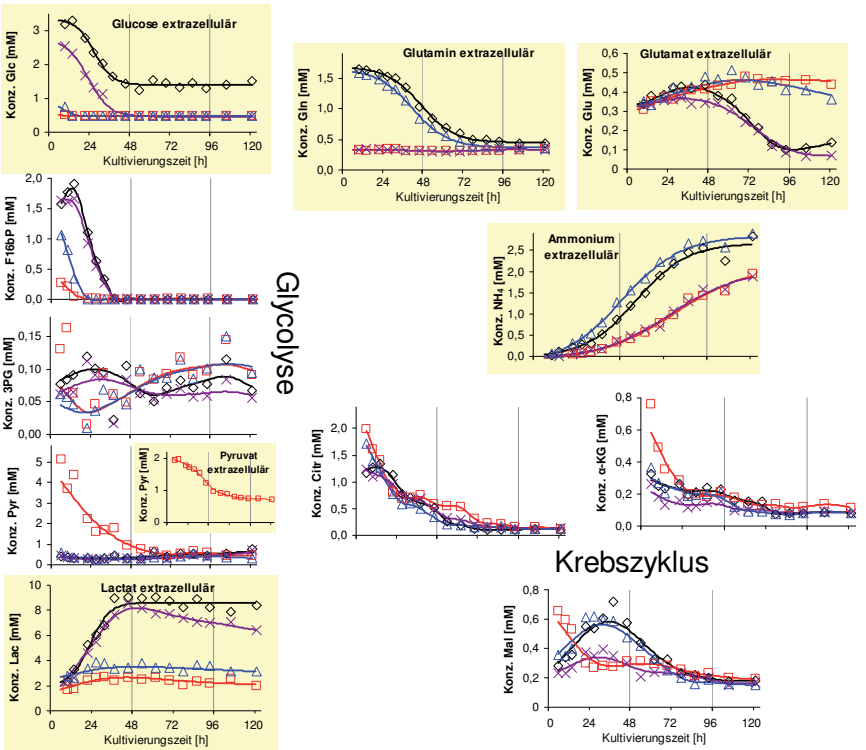


Abbildung 5-25: Verläufe von extra- und intrazellulären Metabolitkonzentrationen bei Kultivierung von MDCK-Zellen in DMEM mit vier verschiedenen Wachstumssubstraten..

Medium mit Glc (2,5 mM) und Gln (2 mM): ◊; Medium mit Glc (2,5 mM): ×; Medium mit Gln (2 mM): △; Medium mit Pyr (2 mM): □ ; gelb hinterlegt sind extrazelluläre Konzentrationen

Für Citrat wurde in allen vier Medien ein kontinuierlicher Konzentrationsabfall gemessen. Zu bemerken ist, dass die Konzentration für das Medium mit Pyruvat meist über den Konzentrationen in den anderen Medien lag. Weiterhin war die Citratkonzentration insbesondere im Anfangsbereich für das Medium, welches nur Glucose enthielt, niedriger als für die anderen Medien. Vergleichbare Konzentrationsverläufe wurden für *cis*-Aconitat und Isocitrat gemessen (nicht dargestellt). Dieses hier beschriebene unterschiedliche quantitative Verhalten der Medien wurde auch in der Konzentration von α-Ketoglutarat wiedergefunden. Auch hier war gerade zu Beginn der Kultivierung im Pyruvat-Medium die Konzentration am höchsten und im Glucose-Medium am niedrigsten. Für alle Medien wurde bei etwa 40 h ein kleines, lokales Maximum durchschritten. Die Konzentrationsverläufe für Malat deuten klare Unterschiede für die vier Medien an. Während für die beiden Medien, welche Glutamin enthielten, ein quantitativ nahezu identischer Verlauf zu erkennen war, war zu dem Glucose-Medium nur eine qualitative Übereinstimmung zu erkennen. Die Konzentrationsverläufe in diesen drei Medien hatten einen niedrigen Startwert und bei etwa 36 h

wurde ein Maximum durchlaufen. Einen deutlich hiervon abweichenden Verlauf zeigte die Malatkonzentration für das Pyruvat-Medium. Hier lag zu Beginn die höchste Konzentration vor. Diese fiel innerhalb der ersten 24 h stark ab. Im weiteren Verlauf war ein leichtes Abfallen der Konzentration zu verzeichnen. Die beiden Metaboliten Succinat und Fumarat (nicht dargestellt) zeigten ein ähnliches Konzentrationsverhalten wie Malat, was heißt, dass etwa bei 30-40 h ein Maximum erreicht wurde. Allerdings waren die Verläufe für diese Metaboliten nicht so stark unterschiedlich ausgeprägt wie das für Malat zu sehen war. Besonders auffällig war für Succinat, dass die Konzentration in dem Medium mit Glutamin deutlich höher lag als für die anderen Medien.

Zusätzlich sind in Abbildung 5-25 die extrazellulären Konzentrationen von Glutamin, Glutamat und Ammonium dargestellt. Für die glutaminhaltigen Medien wurde ein Abfall der Glutaminkonzentration bis etwa 72 h gemessen, was einem typischen Verlauf entspricht. Für die Konzentration von Glutamat wurde für alle Medien zu Beginn ein leichter Anstieg gemessen. Während anschließend die glucosehaltigen Medien einen Abfall der Konzentration zeigten, blieb die Glutamatkonzentration für die beiden anderen Medien relativ konstant bis zum Ende der Kultivierung.

Abbildung 5-26 zeigt die Verläufe von ATP, der *Energy Charge* und UDP-GlcNAc. Für ATP ist deutlich zu erkennen, dass über den gesamten Verlauf unabhängig vom Substrat eine relativ konstante Konzentration vorlag. Die *Energy Charge* zeigte deutliche Unterschiede für die Medien mit und ohne Glucose in den ersten 24 h. Während die glucosefreien Medien zu Beginn einen Wert von etwa 0,92 aufwiesen, war die *Energy Charge* für die glucosehaltigen Medien deutlich niedriger (ca. 0,88). Ab etwa 24 h bewegte sich der Wert für die *Energy Charge* unabhängig vom Medium in einem Fenster von 0,92-0,96. Repräsentativ für die Zuckernukleotide ist UDP-GlcNAc gezeigt. Grundsätzlich war für alle Substrate die Konzentration zu Beginn der Kultivierung hoch und sank bis etwa 48 h stark ab. Allerdings war für die Medien, die Glucose enthielten der Abfall verzögert, bzw. die Konzentration stieg bis 24 h zu einem Maximum an. Für die beiden glucosefreien Medien war nach Beginn der Kultivierung direkt ein Abfall zu messen, wobei für das glutaminhaltige Medium noch eine Unterbrechung des Konzentrationsabfalls bei etwa 30 h vorzufinden war.

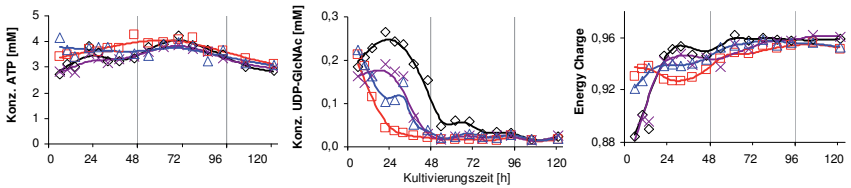


Abbildung 5-26: Verläufe der intrazellulären Konzentrationen von ATP, UDP-GlcNAc und der Energy Charge bei Kultivierung von MDCK-Zellen in DMEM mit vier verschiedenen Wachstumssubstraten.
Medium mit Glc (2,5 mM) und Gln (2 mM): ◊; Medium mit Glc (2,5 mM): ×; Medium mit Gln (2 mM): △; Medium mit Pyr (2 mM): □ ;.

Auch für diese Kultivierungen wurden Kreuzkorrelationsanalysen durchgeführt (nicht dargestellt). Tendenziell zeigten sich vergleichbare Muster in den Kreuzkorrelationsmatrizen wie in Abbildung 5-16. Das heißt, es waren die gleichen Gruppen gut korrelierender Metaboliten unabhängig vom

Substrat zu finden, z. B. korrelierten Zuckerphosphate gut. Die vorgefundenen Unterschiede zwischen den Kultivierungen mit unterschiedlichen Substraten sind im Grunde in den Verlaufskurven wiedergegeben, weshalb auf die Darstellung der Korrelationsmatrix hier verzichtet wurde.

Diskussion

Diese Versuche wurden durchgeführt, um einen Zusammenhang zwischen Energiesubstrat und intrazellulären Metabolitkonzentrationen aufzuklären. Als Basismedium wurde DMEM verwendet. Zu berücksichtigen bei den hier gezeigten Versuchen ist, dass auch für diese Medien keine Adaption der Zellen an die jeweiligen Medien stattfand. Wie bereits oben erwähnt, lag aber die Priorität bei der Versuchsdurchführung darin, identische Zellen zur Einsaat zu verwenden So sollten direkte Effekte des Mediums ermittelt werden.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit GMEM-Z und EpiSerf, konnte nicht für alle hier untersuchten Medien ein gutes Zellwachstum erreicht werden, sondern nur für das Medium mit Glucose und Glutamin (Abbildung 5-24). Verglichen mit den Kultivierungen in GMEM-Z und EpiSerf konnte mit diesem Medium eine ähnliche maximale spezifische Wachstumsrate erzielt werden. Die maximale Zellzahl war für dieses Medium im Vergleich zu GMEM-Z und EpiSerf deutlich niedriger, was höchstwahrscheinlich am niedrigen Glucosegehalt des Mediums lag. Grund für den Einsatz der vergleichsweise niedrigen Glucosekonzentration war, mögliche Indizien für einen effizienteren Stoffwechsel in den intrazellulären Metabolitkonzentrationen zu finden. Es sollte ein Vergleich mit den vorangegangenen Versuchen mit GMEM-Z erfolgen, da diese beiden Medien (GMEM und DMEM) typischerweise ein vergleichbares Zellwachstum für MDCK-Zellen ermöglichen, wurde angenommen, dass eine Übertragung valide ist.

An den deutlich niedrigeren maximalen Zellzahlen in den beiden Medien ohne Glucose ist die essentielle Bedeutung von Glucose für das Wachstum zu erkennen. Ein möglicher Ersatz von Glucose kann allerdings durch andere Zucker erreicht werden. Z. B. konnte mit Fructose anstelle von Glucose ein vergleichbares Wachstum von MDCK-Zellen gezeigt werden [78, 79, 302]. Dennoch vermehrten sich die Zellen auch in den Medien ohne Glucosezugabe. Hierzu ist allerdings zu bemerken, dass in Serum typischerweise minimale Mengen von Glucose (ca. 5 mM) vorliegen, was bedeutet, dass nicht von einem vollständig glucosefreien Medium ausgegangen werden konnte, sondern dass eine Startkonzentration von etwa 0,5 mM vorlag.

Abbildung 5-25 zeigt die Konzentrationsverläufe einiger intra- und extrazellulärer Metaboliten. Die eben erwähnte Glucose war in den beiden glucosehaltigen Medien innerhalb etwa 48 h vollständig verbraucht. Als mögliche Erklärung für den vom Nullwert abweichenden Konzentrationsverlauf der Glucose nach 48 h für das Medium mit Glucose und Glutamin kann ein systematischer Messfehler angegeben werden, da diese Konzentrationen nicht im validierten Bereich der Messmethode lagen (Tabelle 4-1). Der qualitative Verlauf ist dem für das Medium mit Glucose nahezu identisch. Ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen dem Verbrauch der Glucose und einem eingeschränkten Zellwachstum konnte nicht erkannt werden. Wie schon für die Experimente mit GMEM-Z bzw. EpiSerf wurde auch in diesem Experiment die Glucose großteils zu Lactat abgebaut, was im

Verlauf von Lactat zu erkennen war. Dies bedeutet, dass auch bei niedriger Glucosekonzentration der Abbau von Glucose nicht effizienter stattfand, als in Medien mit hoher Glucosekonzentration (GMEM-Z). Zu bemerken ist, dass für das Medium mit Glucose nach etwa 48 h die Lactatkonzentration wieder leicht abfiel, was auf eine Aufnahme und einen Verbrauch von Lactat durch die Zellen schließen ließ. Ebenso konnte kein klarer Zusammenhang des Zellwachstums mit der extrazellulären Glutamin- oder der Glutamatkonzentration nachgewiesen werden. Im Verlauf der Glutamatkonzentration war zu erkennen, dass ein Verbrauch von Glutamat nur dann stattfand, wenn Glucose in dem Medium vorhanden war. Ein deutlicher Verbrauch von Glutamat setzte allerdings erst ein, als die Glucose großteils verbraucht war. Eine Erklärung auf Grundlage des bekannten Stoffwechsels kann allerdings nicht gegeben werden. Einen weiteren interessanten Aspekt deutete der Konzentrationsverlauf von Ammonium an. Nicht nur die Medien, in welchen Glutamin vorlag, zeigten eine signifikante Ausscheidung von Ammonium. Auch in dem Medium mit Pyruvat, in welchem kein Glutamin enthalten war und kein Verbrauch von Glutamat gemessen wurde, war die finale Konzentration von Ammonium bei etwa 1,5 mM. Dies deutete ganz klar an, dass signifikante Mengen weiterer Aminosäuren abgebaut worden sein müssen.

Der Verlauf der extrazellulären Pyruvatkonzentration zeigte ein deutlich negativ korreliertes Verhalten zum Verlauf der Zellzahl. Dies bedeutet, dass bei hohem Zellwachstum auch eine hohe Pyruvataufnahme zu verzeichnen war. Allerdings scheinen die Konzentrationsänderungen von Pyruvat eine Folge des Zellwachstums zu sein, da nämlich die Wachstumsrate nach 72 h deutlich zurückging, aber zu diesem Zeitpunkt noch signifikante Mengen an Pyruvat im Medium vorlagen. Somit ist davon auszugehen, dass die Wachstumsinhibierung durch Limitierung eines anderen Substrates ausgelöst wurde. Wie oben angedeutet, dienten wahrscheinlich Aminosäuren zusätzlich als Substrat und nach dem Verbrauch dieser Aminosäuren war kein Zellwachstum mehr möglich.

Zwar wurden keine zellspezifischen Verbrauchsraten für die Substrate gezeigt, aber allein aus den Diagrammen können gewisse Rückschlüsse auf diese Raten gezogen werden. Der zellspezifische Glucoseverbrauch schien in dem Medium mit Glucose und Glutamin niedriger gewesen zu sein als für das Medium mit Glucose. Ebenso war für das Medium mit Glucose und Glutamin der zellspezifische Glutaminverbrauch scheinbar niedriger als für das Medium mit Glutamin allein. Eine Stimulierung der Glutaminoxidation bei Glucoselimitation wurde in der Vergangenheit bereits für verschiedenen andere Zellen gezeigt [72, 84-87]. Ebenso ist für zahlreiche Zelllinien bekannt, dass die Glutaminoxidation vermindert ist, wenn Glucose im Überschuss vorliegt [83, 87]. Auch für MDCK-Zellen konnten je nach Verfügbarkeit von Glucose unterschiedliche Verbrauchsraten für Glutamin nachgewiesen werden [301]. Dem entgegen wurde in Medien ohne Glutamin aber mit Pyruvat eine deutlich verminderte Glucoseaufnahmegeschwindigkeit gezeigt [21]. Somit sind die in der hier vorliegenden Arbeit gezeigten veränderten Aufnahmeraten für Glucose bzw. Glutamin in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der Substrate durch die Literatur bestätigt.

Bei Betrachtung der intrazellulären Konzentrationsverläufe konnten für einige Metaboliten ganz deutliche Unterschiede erkannt werden. Die Glucosekonzentration im Medium wirkte sich erheblich auf die intrazelluläre F16bP-Konzentration aus. Aufgrund des linearen Aufbaus der

Glykolyse war diese Beobachtung zu erwarten. Interessanterweise konnten auch in den beiden Medien ohne Glucose signifikante Mengen von F16bP nachgewiesen werden. Grund hierfür war höchstwahrscheinlich die durch das Serum eingebrachte Glucose, welche zu Beginn des Experiments abgebaut wurde. Die Tatsache, dass deutliche Mengen an F16bP in den Medien ohne zusätzliche Zugabe von Glucose nachgewiesen wurden, könnte ein Indiz für die sehr effiziente Aufnahme der Glucose sein. Ein weiterer Grund für die signifikanten Mengen an F16bP in den Medien ohne Glucosezugabe könnte eine Aktivität der Enzyme der Gluconeogenese sein. Aufgrund der bekannten Aktivität dieses Stoffwechselweges in Nierengewebe ist nicht auszuschließen, dass MDCK-Zellen unter Glucoselimitation Glykolyseintermediaten aus Pyruvat zu synthetisieren.

Die Konzentrationsverläufe von 3PG (Abbildung 5-25) und PEP (nicht dargestellt) waren sehr ähnlich und es traten erhebliche Änderungen auf. Verglichen mit vorangegangenen Experimenten bzw. Versuchen unter 5.3.2.2 war dieses Verhalten äußerst untypisch für diese Metaboliten, denn normalerweise waren eindeutige, längerfristige Tendenzen im Verlauf der Konzentration dieser Metaboliten zu erkennen. Da sich diese Schwankungen auf 3PG und PEP beschränkten und andere Metaboliten keine derartigen Konzentrationsänderungen zeigten, erscheinen experimentelle Fehler bei der Durchführung dieses Versuches als Erklärung unwahrscheinlich. Allerdings ist das gleichartige Verhalten von 3PG und PEP für die vier verschiedenen Kultivierungen über einen längeren Zeitraum (z. B. letzte drei Punkte der Kultivierung) anhand des Stoffwechsels schwierig zu erklären. Dennoch könnte argumentiert werden, dass die großen Schwankungen im Konzentrationsverlauf von 3PG ein Resultat von regulatorischen Effekten darstellte. So könnte die niedrige Glucosekonzentration Effekte auf die Regulation der Glykolyse bewirkt haben und da die Pyruvat-Kinase einen regulierten Schritt der Glykolyse ist, könnten sich in dem Konzentrationsverlauf von 3PG und PEP regulatorische Effekte verschiedener Ebenen (z. B. metabolische, translatorische, transkriptorische Regulation) widergespiegelt haben. Detaillierte Zusammenhänge können aber basierend auf diesen Daten nicht gegeben werden.

Der Konzentrationsverlauf des intrazellulären Pyruvats zeigte deutlich den Einfluss des extrazellulären Pyruvats auf die intrazellulär gemessene Konzentration. Hierbei stellte sich allerdings die Frage, in wie weit der Messwert für die intrazelluläre Konzentration durch eine Überschleppung des extrazellulären Pyruvats verfälscht wird. Dazu wurde ein Versuch mit Phenolrot als extrazellulärer Marker durchgeführt (nicht gezeigt). Es wurden ca. 0,2% der Ausgangskonzentration von Phenolrot im Zellkulturüberstand in der Probe nach einer vergleichbaren Probenvorbereitung gemessen. Für die gemessenen intrazellulären Pyruvatkonzentrationen bedeutet dies, dass der Wert sich aus zwei etwa gleich großen Anteilen zusammensetzt, wobei der eine die wahre intrazelluläre Konzentration wiedergibt und der andere die Überschleppung aus dem Zellkulturüberstand. In Zahlen bedeutet dies, dass bei einem Messwert von 7 µM nach dem Lösen der Proben ein Anteil von etwa 3 µM aus der extrazellulären Konzentration von Pyruvat (für 2000 µM) resultiert. Da dies aber nur eine grobe Abschätzung ist und weitere Einflussgrößen berücksichtigt werden sollten, wäre eine genaue Untersuchung dieses Problems noch durchzuführen. Dennoch wäre selbst für den schlechten Fall, dass 0,25% der extrazellulären Konzen-

tration in die intrazelluläre Probe übertragen würden, die tatsächliche intrazelluläre Konzentration deutlich höher gewesen, als die der Kultivierungen in den anderen Medien.

Der Verlauf der intrazellulären Citratkonzentration erschien vergleichsweise ähnlich für die verschiedenen Medien. Allerdings waren insbesondere zu Beginn der Kultivierung höhere Konzentrationen für die Medien mit Pyruvat und Glutamin gemessen worden, als für die beiden anderen Medien. Eine mögliche Erklärung wäre, dass diese beiden Substrate, da sie über den Krebszyklus abgebaut werden können, einen Anstieg der Citratkonzentration bewirken. Somit wäre die Erhöhung des Flusses durch den Krebszyklus mit einem Konzentrationsanstieg von Citrat korreliert. Allerdings sind die Unterschiede zwischen den Medien eher gering und es wäre in weiteren Versuchen zu überprüfen, ob hier eine Signifikanz vorliegt. Ab etwa 24 h lag die Citratkonzentration im Glutaminmedium unter der Konzentration in den beiden Medien mit Glucose. Im Pyruvatmedium traten in dem Zeitraum zwischen etwa 30-70 h höhere Konzentrationen als in den anderen Medien auf. Auch für diese Phase des Experiments könnten die Substrate eine entscheidende Rolle bei der Konzentration der intrazellulären Zwischenprodukte gespielt haben.

Die Verläufe von α-Ketoglutarat und Malat zeigten, wie auch für Citrat, die höchsten Anfangskonzentrationen für das Medium mit Pyruvat. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass die Aktivität des Krebszyklus durch das Substrat beeinflusst ist. Insbesondere für Malat wurde in Abhängigkeit vom Medium ein charakteristischer Verlauf gemessen. Die beiden Medien, die Glutamin enthielten, verhielten sich sehr ähnlich. Scheinbar beeinflusste Glutamin erheblich die intrazelluläre Konzentration von Malat.

Grundsätzlich zeigte sich für die Intermediate des Krebszyklus ein vergleichbares Konzentrationsverhalten für die beiden Medien, die Glutamin enthielten. Während das Medium mit Pyruvat gerade zu Beginn der Kultivierung höhere Konzentrationen der Krebszyklusmetaboliten bewirkte, waren für das Medium mit ausschließlich Glucose die Konzentrationen über den Verlauf des Versuchs niedriger als für die anderen Medien. Diese gleichartigen Tendenzen für mehrere Metaboliten in Abhängigkeit vom Medium weisen auf mögliche Unterschiede im Stoffwechsel hin, die mit Metabolitkonzentrationen assoziiert sind.

Ein weiterer erwähnenswerter Aspekt sind die sehr ähnlich verlaufenden ATP-Konzentrationen. Insbesondere ab etwa 60 h sind nahezu keine Unterschiede zwischen den Konzentrationen von ATP in den verschiedenen Medien auszumachen. In dem Zeitraum bis etwa 48 h lagen die Konzentrationen der Medien mit Glucose unter den Konzentrationen in den anderen beiden Medien. Über einen kurzen Zeitraum könnte das Absinken der ATP-Konzentration aufgrund der Übertragung von Phosphat von ATP auf Glucose in Frage kommen. Dieses Phänomen wurde in der Vergangenheit für Krebszellen beobachtet [89, 290, 303]. Allerdings fand dies in einem Zeitraum von wenigen Minuten statt. Des Weiteren ist für Hefen ein Phänomen namens ATP-Paradox bekannt, welches besagt, dass bei Glucoseüberschuss die intrazelluläre ATP-Konzentration erniedrigt ist, verglichen mit einem Zustand der Glucoselimitation [140, 212, 304].

Besonders auffällig im Verlauf der *Energy Charge* war, dass für die beiden Medien mit Glucose die Werte der ersten drei Probenahmezeitpunkte deutlich unter den Werten der beiden Medien ohne Glucose lagen. Der im Zusammenhang mit ATP erwähnte Aspekt der Phosphorilierung von Glucose als erster Schritt der Glykolyse könnte zwar eine Rolle für das Absinken in den Glucose-Medien gespielt haben, allerdings ist der Zeitraum, über welchen sich die erniedrigte *Energy Charge* erstreckte, sehr lang (> 12 h). Somit scheint ein regulatorischer Effekt deutlich plausibler. Bis 24 h stieg die *Energy Charge* für die Medien mit Glucose auf ein Niveau, welches deutlich über dem der beiden glucosefreien Medien lag. Scheinbar wurde bis dahin das initiale Absinken der *Energy Charge* kompensiert. Der Verlauf der *Energy Charge* ab etwa 70 h ist nahezu unbeeinflusst vom Medium. Auch trotz des vollständigen Verbrauchs von Glucose und Glutamin für die entsprechenden Medien war kein Absinken der *Energy Charge* zu verzeichnen. Als Ursache wird hier eine verminderte Stoffwechselaktivität der Zellen gepaart mit dem Verbrauch von nicht gemessenen Energiequellen vermutet. Das bedeutet, dass wahrscheinlich weitere Medienkomponenten von den Zellen abgebaut wurden oder evtl. intrazelluläre Speicherstoffe, Proteine oder andere Makromoleküle abgebaut wurden, um den Wert der *Energy Charge* auf einem hohen Niveau halten zu können. Aus der Literatur ist bekannt, dass die *Energy Charge* bei kultivierten tierischen Zellen mitunter längere Zeit unter limitierten Zuständen auf einem hohen Niveau gehalten wird [117, 178].

Besonders zu erwähnen ist der Konzentrationsverlauf von UDP-GlcNAc. Erhebliche Unterschiede waren für die verschiedenen Medien zu erkennen. Ein interessanter Aspekt hierbei ist, dass die Anfangskonzentrationen bei der ersten Probennahme für die verschiedenen Medien in einem sehr ähnlichen Bereich lagen. Grund hierfür könnte sein, dass entweder die Unterschiede der Medien keine Konzentrationsänderungen in diesem frühen Stadium der Kultivierung bewirkten, oder, dass die Unterschiede sich nicht mit einer entsprechenden Geschwindigkeit in einer Konzentrationsänderung dieses Metaboliten niederschlugen und somit zu diesem Zeitpunkt noch die aus der gemeinsame Vorkultur resultierenden gleichen Konzentrationen vorlagen. Wie bereits für die Kultivierungen in GMEM-Z und Episerf bemerkt, schien im weiteren Verlauf der Kultivierungen die Glucosekonzentration einen signifikanten Einfluss zu haben [96]. Der in der Literatur erwähnte Einfluss der Ammoniumkonzentration auf die intrazelluläre Konzentration von UDP aktivierten Aminohexosen konnte nicht direkt nachvollzogen werden. Ursache hierfür war sicherlich die Überlagerung dieses Effektes mit dem Einfluss der Glucose. Generell war aber zu erkennen, dass für MDCK-Zellen nach dem Verbrauch von Glucose nur geringe Mengen von UDP-GlcNAc intrazellulär zu finden waren.

Die gezeigten Kultivierungsexperimente deuteten sowohl in GMEM-Z und EpiSerf, als auch in DMEM die Abhängigkeiten der intrazellulären Metabolitkonzentrationen vom Medium an. Zusätzlich waren ganz klar Konzentrationsunterschiede über den Verlauf einer *Batch*-Kultivierung zu erkennen. Daraus ist zu schließen, dass für die meisten Metabolitkonzentrationen während einer *Batch*-Kultivierung keine Homöostase herrscht, sondern regulatorische Effekte in den intrazellulären Konzentrationen widergespiegelt bzw. durch diese Konzentrationsänderungen bedingt werden. Darüber hinaus zeigten die mitunter entgegengesetzten Konzentrationsverläufe unterschied-

licher Metaboliten, dass während einer typischen *Batch*-Kultivierung von MDCK-Zellen über die meiste Zeit kein stationärer Zustand herrscht. Eventuell ist in der Endphase einer Kultivierung (>120 h) über wenige Stunden ein konstantes Konzentrationsverhalten vorhanden, denn in diesem Zeitraum wurden für die meisten Metaboliten nur geringe Konzentrationsänderungen gemessen.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zu *Batch*-Kultivierungen von MDCK-Zellen lassen den Schluss zu, dass je nach physiologischem Zustand, also in Abhängigkeit von z. B. der Wachstumsphase oder dem Zellkulturmedium, ein charakteristisches Konzentrationsmuster der intrazellulären Metaboliten des Zentralstoffwechsels existiert.

Anhand der gezeigten Versuche konnte man sich ein relativ gutes Bild der Metabolitkonzentrationen und deren Verläufe in typischen *Batch*-Kultivierungen für MDCK-Zellen machen. Grundsätzlich stellt sich aber die Frage, wie weit MDCK-Zellen repräsentativ für andere Zelllinien sind, bzw. welche Unterschiede für verschiedene Zelllinien auftreten. Aus diesem Grund erfolgten im Rahmen dieser Arbeit einige Versuche mit Vero-Zellen.

5.3.3 Kultivierung von Vero-Zellen

Neben MDCK-Zellen sind auch Vero-Zellen eine wichtige Produktionszelllinie für die Impfstoffherstellung. Da auch diese Zellen den typischen Stoffwechsel von kontinuierlichen Zelllinien zeigen, besteht hier ebenfalls ein Interesse an der genaueren Charakterisierung des metabolischen Verhaltens dieser Zellen. Diese Zelllinie wächst ebenso wie MDCK-Zellen adhärent, weshalb eine direkte Übertragung der Probenvorbereitung möglich schien. Für mehrere Kultivierungsversuche wurden intrazelluläre Metabolitkonzentrationen bestimmt. Eine erste Kultivierung fand im Medium GMEM-Z statt (nicht gezeigt), wobei bestätigt werden konnte, dass eine Anwendbarkeit der Probenvorbereitungsmethode für diese Zelllinie möglich ist. Zusätzlich waren mitunter deutliche Unterschiede zu MDCK-Zellen zu erkennen.

In ähnlicher Form wie die Versuche unter 5.3.2.3 wurden auch für Vero-Zellen vier parallele Kultivierungen in Sechs-Well-Platten in DMEM-Medium mit verschiedenen Substraten durchgeführt (1: +Glc (25 mM) + Gln (2 mM); 2: +Glc (25 mM); 3: + Gln (2 mM); 4: + Pyr (2 mM)). Eine vollständige Beschreibung dieser Experimente erlaubt der Rahmen dieser Arbeit nicht, allerdings sind exemplarisch einige Konzentrationsverläufe in Abbildung 5-27 gezeigt.

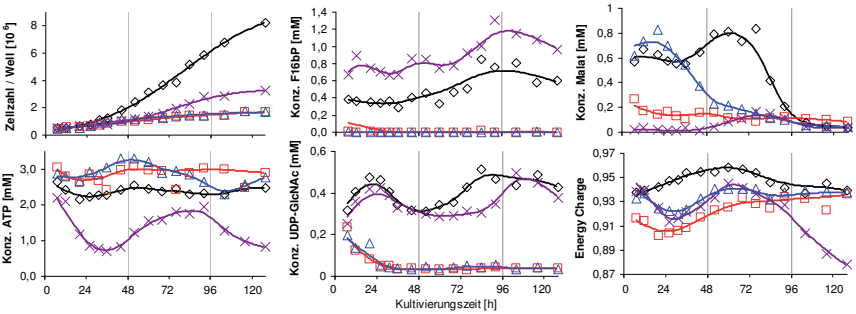


Abbildung 5-27: Verläufe von Zellzahl, intrazellulären Metabolitkonzentrationen und der Energy Charge bei Kultivierung von Vero-Zellen in DMEM mit vier verschiedenen Wachstumssubstraten.
Medium mit Glc (25 mM) und Gln (2 mM): ◊; Medium mit Glc (2,5 mM): ×; Medium mit Gln (2 mM): △; Medium mit Pyr (2 mM): □.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit MDCK-Zellen mit DMEM, wurde für Vero-Zellen eine Startkonzentration von Glucose von 25 mM eingesetzt, um einen Vergleich zu den vorangegangenen Experimenten in GMEM-Z zu haben. Beide Medien resultierten in sehr ähnlichen Verläufen von sowohl Zellzahlen als auch extra- und intrazellulären Metabolitkonzentrationen (nicht gezeigt).

Der Verlauf der Zellzahlen zeigte eindeutig, dass sowohl Glucose als auch Glutamin essentiell für ein gutes Wachstum von Vero-Zellen ist. Der Verbrauch dieser beiden Substrate (nicht gezeigt) entsprach den typischen Verläufen, was bedeutet, dass Glucose bis zum Ende der Kultivierungen nahezu vollständig aufgebraucht war. Glutamin war bereits nach etwa 80 h verbraucht. Die daraus resultierenden Abfallprodukte Lactat und Ammonium wurden ausgeschieden. Lactat wurde ausschließlich von den Kulturen in glucosehaltigen Medien freigesetzt. Ammonium wurde von allen Kulturen ausgeschieden, wobei die höchste Konzentration im Medium mit Glutamin erreicht wurde (ca. 2 mM), gefolgt vom Medium mit Glucose und Glutamin (ca. 1,5 mM). Auch in den glutaminfreien Medien wurde Ammonium freigesetzt (Pyr: ca. 1 mM; Glc; 0,6 mM). Zusätzlich wurde von allen Kulturen Glutamat ausgeschieden.

Von den intrazellulären Metabolitkonzentrationen sind insbesondere die in Abbildung 5-27 dargestellten zu erwähnen. Für F16bP zeigte sich deutlich, dass nur in den Medien, in welchen Glucose vorhanden war, auch signifikante intrazelluläre Konzentrationen dieses Intermediates auftraten. Dabei waren die gemessenen Konzentrationen über den gesamten Kulturverlauf relativ konstant. Die Konzentration von F16bP war im Medium, welches neben Glucose kein Glutamin enthielt, deutlich höher, als in dem Medium, welches zusätzlich zu Glucose Glutamin enthielt. Malat als Zwischenprodukt des Krebszyklus, zeigte klare Konzentrationsunterschiede in Abhängigkeit vom Substrat. Während im Medium mit Glucose und Glutamin über ca. 72 h ein relativ hoher Wert und anschließend ein deutlicher Abfall gemessen wurden, war für das Medium mit Glutamin alleine ein Abfall bereits nach 42 h zu verzeichnen. Die beiden Medien ohne Glutamin wiesen erheblich geringere Konzentrationen von Malat auf, wobei das Pyruvat-Medium

eine höhere intrazelluläre Malatkonzentration bewirkte als das Medium mit Glucose. Die ATP-Konzentration zeigte einen konstanten Verlauf über den Kulturverlauf für alle Medien mit Ausnahme des Glucose-Mediums. In diesem Medium waren zuerst ein Konzentrationsabfall bis etwa 30 h, danach ein Anstieg bis etwa 80 h und anschließend ein Abfall bis zum Ende der Kultivierung zu messen. Darüber hinaus lag die Konzentration von ATP für dieses Medium deutlich niedriger als in den anderen Medien. Die höchsten intrazellulären ATP-Konzentrationen wurden für die Medien mit Pyruvat und Glutamin gemessen (ca. 3 mM). Die Konzentration für das Medium mit Glucose und Glutamin lag in einem Bereich von 2-2,5 mM. Der Verlauf der *Energy Charge* zeigte für das Medium mit Glucose und Glutamin einen leichten Anstieg auf einen Wert von etwa 0,96 (bis ca. 70 h), woran sich ein leichter Abfall bis zum Ende der Kultivierung anschloss. Bei den Kultivierungen in den anderen Medien fand zuerst ein leichter Abfall der *Energy Charge* statt (bis etwa 24 h), danach stieg der Wert an bis etwa 70 h. Anschließend blieb für die beiden Medien mit Pyruvat bzw. Glutamin der Wert relativ konstant bei 0,93. Das Glucose-Medium zeigte nach 70 h einen deutlichen Abfall der *Energy Charge* bis auf einen Wert von etwa 0,88.

In Abbildung 5-27 ist zusätzlich noch der Verlauf der Konzentration von UDP-GlcNAc dargestellt. Ganz klar zu erkennen war der Einfluss von Glucose auf diesen Metaboliten. Während die Startkonzentration für alle Zellen sehr ähnlich war, sank für die glucosefreien Medien der Wert innerhalb von 24 h auf sehr niedrige Konzentrationen und für die glucosehaltigen Medien fand ein Anstieg statt. Nach einem Maximum der Konzentration folgte ein Abfall der Konzentration, ein Minimum wurde durchlaufen und gegen Ende der Kultivierung stieg die Konzentration wieder an.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass somit auch für Vero-Zellen verschiedene Metaboliten unterschiedliche Konzentrationen und Konzentrationsverläufe während einer *Batch*-Kultivierung aufwiesen. Zusätzlich war klar zu erkennen, dass unterschiedliche Medien klare Effekte auf die intrazellulären Metabolitkonzentrationen haben.

Diskussion

Die gezeigten Daten zu Vero-Zellen (Abbildung 5-27) verdeutlichen die großen Unterschiede zu MDCK-Zellen (s. Abbildung 5-18, Abbildung 5-19 und Abbildung 5-20). Für DMEM mit Glucose und Glutamin wurden erheblich höhere Zellzahlen erreicht als für MDCK-Zellen unter vergleichbaren Bedingungen (GMEM-Z). Da Vero-Zellen in mehreren übereinanderliegenden Zellschichten wachsen und somit nicht durch die Fläche wachstumslimitiert sind, ist dieser Unterschied allerdings nicht überraschend [305]. Die Abhängigkeit eines guten Zellwachstums von den Substraten Glucose und Glutamin ist deutlich durch die Wachstumskurven dokumentiert. Dieses Verhalten war in Vero-Zellen erheblich stärker ausgeprägt als für MDCK-Zellen. Der Konzentrationsverlauf von F16bP für Vero-Zellen war in den glucosehaltigen Medien während des gesamten Kulturverlaufs nahezu konstant, was ein vollkommen anderes Bild darstellt, als für MDCK-Zellen. Scheinbar war die Konzentration von F16bP in Vero-Zellen vom Zellwachstum bzw. der Zellzahl entkoppelt.

Auch für Malat wurde ein gänzlich anderer Konzentrationsverlauf für Vero-Zellen gemessen als für MDCK-Zellen. Als Gemeinsamkeit kann allerdings bemerkt werden, dass für die Medien mit

Glucose als einzigem zugesetztem Substrat, die Konzentration von Malat in beiden Zelllinien am niedrigsten war. Das Medium mit Pyruvat konnte ebenfalls in beiden Zelllinien keine mit den glutaminhaltigen Medien vergleichbaren Malatkonzentrationen bewirken. Darüber hinaus sank für beide Zelllinien gegen Ende der Kultivierungen die Konzentration auf ein relativ niedriges Niveau ab. Während bei MDCK-Zellen eine gewisse zeitliche Übereinstimmung mit dem Verbrauch von Glutamin vorzuliegen schien, konnte diese Koinzidenz bei Vero-Zellen nicht beobachtet werden.

Mit Ausnahme von glucosehaltigem Medium war ebenso wie bei MDCK-Zellen die intrazelluläre ATP-Konzentration für die Medien relativ konstant. Der bei MDCK-Zellen auftretende leichte Konzentrationsabfall gegen Ende der Kultivierung konnte aber für Vero-Zellen nicht nachgewiesen werden. Die starken Schwankungen in der ATP-Konzentration für das Glucose-Medium bei Vero-Zellen waren für MDCK-Zellen nicht zu finden und eine Erklärung basierend auf diesen Experimenten kann nicht abgegeben werden. Die *Energy Charge* war bei Vero-Zellen im Medium mit Glucose und Glutamin fast über den gesamten Kultivierungsverlauf höher als für die anderen Medien. Eventuell besteht bei Vero-Zellen ein Zusammenhang zwischen einem hohen Wert der *Energy Charge* und einem guten Zellwachstum, denn die anderen Medien resultierten in deutlich niedrigeren Zellzahlen. Der auffällige Einbruch der *Energy Charge* in den Zellen in glucosehaltigem Medium gegen Ende der Kultivierung könnte darauf zurückzuführen sein, dass weitere Substrate neben Glucose, wie z. B. Aminosäuren, verbraucht waren. Burgener et al. untersuchten die Auswirkungen von verschiedenen Medien auf die intrazellulären Nukleotidkonzentrationen [25]. Hierbei zeigte sich, dass der ATP-Gehalt der Zellen deutlich erniedrigt war, wenn die Glutaminkonzentration im Medium reduziert war. Auch in den Zellen im glucosefreien Medium waren signifikant geringere ATP-Mengen zu finden. Allerdings waren die Zellen nicht während der kompletten Kultivierungsdauer den Medien ausgesetzt, sondern nur für eine Periode von 24 h am Ende der Zellwachstumsphase. Somit ist zwar ein exakter Vergleich der dort erzielten Ergebnisse mit der hier vorliegenden Arbeit schwierig, aber die grundlegende Tendenz, dass in Vero-Zellen mitunter ein sehr variabler ATP-Gehalt vorliegen kann, bestätigt.

Die Verläufe von UDP-GlcNAc zeigten ganz deutlich die Abhängigkeit dieser Metabolitkonzentration von der extrazellulären Glucosekonzentration. Die beiden Medien ohne Zugabe von Glucose wiesen nur zu Beginn der Kultivierung erhöhte Werte dieses Metaboliten auf. Grund hierfür war sicherlich die durch das Serum eingebrachte Menge an Glucose bzw. die noch aus der Vorkultur vorhandene intrazelluläre Konzentration von UDP-GlcNAc. Scheinbar ist aber keine direkte Korrelation zwischen der extrazellulären Glucosekonzentration und der intrazellulären UDP-GlcNAc-Konzentration vorhanden, da die intrazelluläre Konzentration von UDP-GlcNAc relativ konstant war, wohingegen die extrazelluläre Konzentration von Glucose für die beiden Medien mit Glucose über die Kultivierungsdauer bis auf relativ niedrige Werte abnahm. Ein deutlicher Zusammenhang der intrazellulären Konzentration von UDP-GlcNAc zur extrazellulären Konzentration von Ammonium, wie oben diskutiert, konnte auch für Vero-Zellen nicht nachgewiesen werden. Somit ist das Konzentrationsverhalten dieses Metaboliten in Vero-Zellen dem in MDCK-Zellen relativ ähnlich.

5.3.4 Pulsexperimente mit MDCK-Zellen

Nach den oben beschriebenen Experimenten, die ein Bild von typischen Konzentrationsverläufen während einer *Batch*-Kultivierung bei Verwendung verschiedener Medien geben sollten, war es das Ziel in den in diesem Abschnitt dargestellten Versuchen, ein besseres Verständnis der Dynamik der Metabolitkonzentrationen zu erreichen. Dazu wurden schnelle Änderungen in der extrazellulären Umgebung erzeugt und die darauf folgenden Effekte in den intrazellulären Metabolitkonzentrationen gemessen. Während für die oben erwähnten Kultivierungsexperimente genauestens auf die Unterschiede zwischen Metabolitmengen und Metabolitkonzentrationen und deren Bezug geachtet wurde (s. Tabelle 4-2), werden diese Begriffe in diesem Abschnitt gleichbedeutend genutzt. Grund hierfür ist, dass in den Zeiträumen dieser Experimente (< 2 h) von konstanten Zellvolumina und Zellzahlen ausgegangen wurde. Somit waren die Werte für Metabolitmengen und Metabolitkonzentrationen über eine Konstante verknüpft und deshalb in ihrem qualitativen Verhalten identisch.

5.3.4.1 Austausch von Medium durch PBS

Hierfür wurden MDCK-Zellen in GMEM-Z bis in das Stadium des späten exponentiellen Wachstums kultiviert (ca. 3 Tage). Der Versuch wurde durchgeführt, indem das Medium entfernt und nach einem Waschschritt (mit PBS) durch PBS ersetzt wurde. Diese schlagartige Limitierung bezüglich sämtlicher Substrate sollte klare Änderungen in den intrazellulären Metabolitkonzentrationen hervorrufen. Da ursprünglich nur geringe Vorkenntnisse zur Geschwindigkeit der Veränderungen in den Metabolitpools vorhanden waren, wurde dieses Experiment mehrmals, allerdings mit unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten und Experimentzeiträumen, durchgeführt. Das erste Experiment umfasste eine Dauer von 90 min, das zweite 120 min und das dritte 6 min. Dementsprechend wurden zu deutlich unterschiedlichen Zeitpunkten Proben genommen. Während die Zeitpunkte der Probenahmen der ersten beiden Experimente auf einer linearen Zeitskala geplant wurden, wurde für das dritte Experiment in logarithmisch äquidistanten Zeitabständen Probe genommen. Ursache hierfür war die unzureichende Auflösung der Konzentrationsverläufen mancher Stoffwechselprodukte in der Anfangsphase der Experimente 1 und 2. Abbildung 5-28 zeigt die Verläufe der normierten Metabolitkonzentrationen auf einer logarithmisch skalierten Zeitachse. Da sich, wie in den Kultivierungsexperimenten, Verläufe verschiedener Metaboliten ähnlich verhielten und somit eine Gruppierung möglich war, sind nur einige, exemplarische Verläufe gezeigt. Auf die Verläufe der weiteren Metaboliten kann durch die Kreuzkorrelationsmatrix (Abbildung 5-30) rückgeschlossen werden.

Als erster Metabolit der Glykolyse zeigte G6P nach dem Substratentzug nach kurzer Verzögerung einen deutlichen Abfall der Konzentration. Für Experiment 2 lagen die Werte nach ca. 1 min deutlich höher und schwankten relativ stark. Einen sehr ähnlichen Verlauf wies die Konzentration von F6P auf (nicht dargestellt). Ein eindeutiges Verhalten zeigte der Verlauf von F16bP. Nach einer konstanten Konzentration in etwa den ersten 0,5 min fiel innerhalb 1 min die Konzentration auf einen nicht nachweisbaren Wert. Die Konzentration des nächsten gemessenen Metaboliten der Glykolyse, 3PG, verhielt sich dem entgegengesetzt. Nach einem relativ konstanten Niveau zu

Beginn der Experimente bis etwa 3 min, erfolgte in den folgenden 30-40 min ein Anstieg der Konzentration auf etwa das Dreifache des Startwertes. Danach schloss sich ein leichter Konzentrationsabfall an. Der Verlauf der Konzentration von PEP war dem von 3PG nahezu identisch (nicht gezeigt). Die gemessene Pyruvatkonzentration fiel über den gesamten Verlauf ab. Ein leichtes Wellenverhalten war zu erkennen, wobei die lokalen Maxima bei etwa 1,5 min bzw. 30 min lagen.

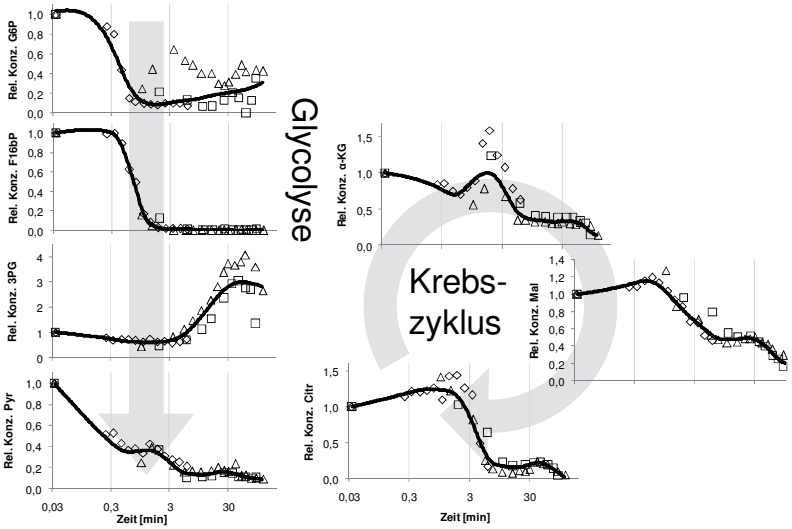


Abbildung 5-28: Konzentrationsverläufe intrazellulärer Metaboliten aus Glykolyse und Krebszyklus in MDCK-Zellen in einem Zeitraum von 2 h nach dem Ersetzen des Zellkulturmediums durch PBS.
Aufgetragen sind relative Konzentrationen, normiert auf den Anfangswert des jeweiligen Experiments; Experiment 1: Δ; Experiment 2: □; Experiment 3: ◊. Um eine logarithmische Darstellung zu ermöglichen, wurde der erste Messpunkt (vor dem Austausch des Mediums durch PBS) auf einen Zeitpunkt t = 0,03 min positioniert.

Wiederum ein anderes Verhalten im Konzentrationsverlauf war für Citrat zu erkennen. Ausgehend von einem relativ hohen Anfangswert fand innerhalb der ersten 2 min ein leichter Anstieg statt. Danach fiel die Konzentration bis 5 min stark ab und es schloss sich ein Bereich mit nahezu konstanter Konzentration an. Ein leichtes lokales Maximum war bei etwa 45 min zu erkennen. Ein fast identisches Verhalten zeigten die Metaboliten *cis*-Aconitat und Isocitrat. Die beiden Metaboliten α-Ketoglutarat und Succinat ähnelten sich im Konzentrationsverlauf stark, allerdings war der Verlauf von Succinat (nicht gezeigt) etwas verzögert verglichen mit α-Ketoglutarat. Für α-Ketoglutarat war ein anfänglicher Abfall der Konzentrationen bis etwa 0,5 min zu verzeichnen, gefolgt von einem Anstieg bis etwa 2 min. Danach fiel der Wert bis 5 min wonach sich ein Plateau anschloss. Nach 50 min schien ein erneuter Abfall der Konzentration einzutreten. Die Konzentrationen der im Krebszyklus folgenden Metaboliten, Fumarat (nicht gezeigt) und Malat waren einander sehr ähnlich. Nach einem Konzentrationsanstieg bis zu einem Maximum bei etwa 0,5 min sanken die Werte bis ca. 7 min auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes. Daraufhin folgte

ein Bereich mit relativ konstanter Konzentration bzw. einem leichten Anstieg. Nach etwa 40 min setzte ein erneutes Abfallen der Konzentration bis zum Ende der Experimente ein.

Somit zeigten alle Metaboliten aus Glykolyse und Krebszyklus mit Ausnahme von 3PG und PEP spätestens 30 min nach dem Entfernen des Zellkulturmediums einen deutlichen Konzentrationsabfall. Allerdings waren in den Verläufen erhebliche Unterschiede zu sehen. Während bei den Zuckerphosphaten ein relativ schnelles Abfallen der Konzentration gemessen wurde, fand bei den meisten organischen Säuren zuerst ein leichter Anstieg statt.

Abbildung 5-29 zeigt die Verläufe ATP, UDP-GlcNAc und der *Energy Charge*. Im Allgemeinen waren die Änderungen der Nukleotide und Zuckernukleotide nach dem Entfernen des Mediums deutlich geringer als bei den Metaboliten aus Glykolyse und Krebszyklus. Insbesondere ATP, CTP (nicht gezeigt) und UDP-GlcNAc waren nahezu konstant über den untersuchten Zeitraum. Alle Nukleosidmonophosphate und –diphosphate verhielten sich ähnlich (nicht dargestellt). Bis ca. 0,5 min fand ein leichter Anstieg statt, danach fiel die Konzentration dieser Metaboliten langsam ab. Weiterhin ist die *Energy Charge* gezeigt, allerdings fand bei dieser Variablen keine Normierung auf den Anfangswert statt. Nach einem relativ hohen Anfangswert sank die *Energy Charge* bis etwa 0,5 min wonach ein Anstieg folgte, der sein Maximum nach etwa 40 min hatte. Anschließend deutete sich ein Abfall der *Energy Charge* an. Der Anstieg der *Energy Charge* trotz Abfall der ATP-Konzentration kann durch den Abfall der Konzentrationen von sowohl ADP als auch AMP erklärt werden.

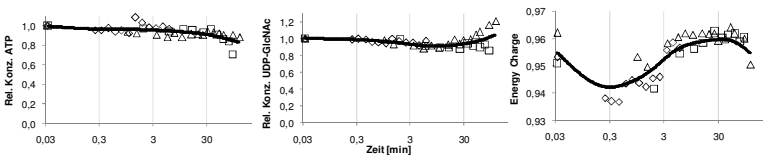


Abbildung 5-29: Verläufe der intrazellulären Konzentrationen von ATP und UDP-GlcNAc sowie der Energy Charge in MDCK-Zellen in einem Zeitraum von 2 h nach dem Ersetzen des Zellkulturmediums durch PBS.

Aufgetragen sind relative Konzentrationen, normiert auf den Anfangswert des jeweiligen Experiments; für die Energy Charge erfolgte keine Normierung; Experiment 1: Δ; Experiment 2: □; Experiment 3: ◊. Um eine logarithmische Darstellung zu ermöglichen, wurde der erste Messpunkt (vor dem Austausch des Mediums durch PBS) auf einen Zeitpunkt t = 0,03 min positioniert.

Wie schon bei den Kultivierungsexperimenten erwähnt, ist für einen besseren Überblick des Verhaltens der verschiedenen Metaboliten die Darstellung in Form einer Kreuzkorrelationsmatrix gewählt worden (Abbildung 5-30).

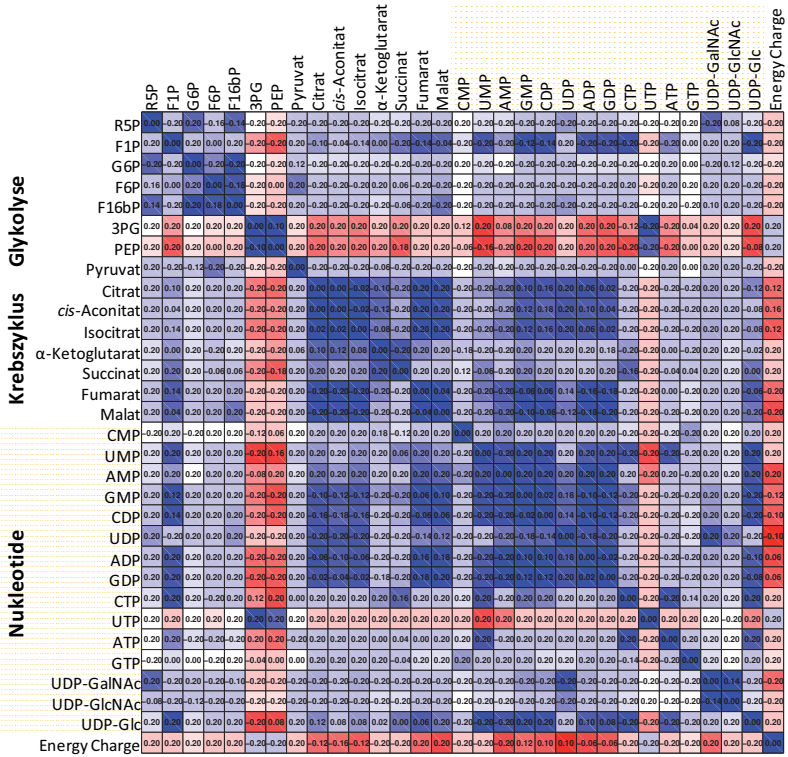


Abbildung 5-30: Kreuzkorrelationsmatrix für MDCK-Zellen nach dem Ersetzen des Zellkulturmediums durch PBS.

Zur genauen Erläuterung sein auf Abbildung 5-21 verwiesen; die Zahlen in den einzelnen Feldern entsprechen dem Zeitversatz in log (min).

Besonders auffällig in Abbildung 5-30 war das Verhalten von 3PG und PEP. Wie sich schon in den einzelnen Verläufen in Abbildung 5-28 angedeutet hat, war der Konzentrationsverlauf dieser beiden Metaboliten entgegengesetzt zu dem Verlauf der meisten anderen Stoffwechselprodukte. Zusätzlich war mit diesen beiden Metaboliten UTP relativ gut korreliert. Einen weiterer Block von ähnlichen Konzentrationsverläufen bildeten Zuckerphosphate. Die meisten organischen Säuren, Mono- und Diphosphonukleoside befanden sich in einer Gruppe von korrelierenden Metaboliten. Besonders hohe Korrelationskoeffizienten wurden für Citrat, *cis*-Aconitat und Isocitrat, α-Ketoglutarat und Succinat, wie auch Malat und Fumarat errechnet. Weiterhin waren Nukleosidmonophosphate und -diphosphate mit Ausnahme von CMP sehr stark korreliert. Auch diese Metaboliten zeigten einen Konzentrationsabfall im Verlauf des Experiments (nicht dargestellt), aber verglichen mit Zuckerphosphaten und organischen Säuren, die um bis zu 90% der Ausgangskonzentration fielen, handelte es sich hier um etwa 20-30%. Der Verlauf der Konzentration von Pyruvat war schwach mit

einigen Metaboliten aus der Glykolyse korreliert und wies sonst nur geringe Übereinstimmungen mit den Verläufen anderer Metaboliten auf. GTP und CMP waren miteinander korreliert, aber nicht mit anderen Metaboliten. Ebenso nur geringe Korrelationen mit anderen Stoffwechselprodukten wiesen ATP und CTP auf. Die Konzentrationsverläufe dieser beiden Nukleotide waren miteinander gut korreliert und zusätzlich waren sie mit den Verläufen von UMP und F1P korreliert. Die beiden Zuckernukleotide UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc waren stark positiv miteinander korreliert und zeigten schwache Korrelationen zu anderen Metaboliten. Auffällig war das Korrelationsverhalten der *Energy Charge*. Zur Mehrzahl der aufgeführten Stoffwechselprodukte bestand eine negative Korrelation. Nur zu 3PG, PEP und UTP war eine positive Korrelation vorhanden.

Insgesamt gesehen wurde durch den in diesem Versuch durchgeführten Medienentzug für eine ganze Reihe von Metaboliten ein kurz- oder mittelfristiger Abfall der Konzentration ausgelöst. Eine Ausnahme bildeten die beiden Metaboliten 3PG und PEP, deren Konzentration im Verlauf dieser Experimente anstieg. Insbesondere Nukleosidtriphosphate wiesen über den gesamten Versuchszeitraum eine nahezu konstante Konzentration auf. Während sich somit einige Metaboliten über ihre Tendenzen gruppieren ließen, waren die Geschwindigkeit der Konzentrationsänderungen und der genaue Verlauf aber je nach Metabolit stark unterschiedlich.

Diskussion

Die Hypothese zu den Vorgängen bei einem Austausch von Medium durch PBS war, dass die verschiedenen Stoffwechselzwischenprodukte nach dem Entzug der Nährstoffquelle in ihren Konzentrationen abfallen. Als offene Frage galt zu klären, mit welcher Geschwindigkeit dieser Abfalls in Abhängigkeit vom Metabolit bzw. der Metabolitklasse ausfällt, bzw. ob manche Metaboliten in den kurzen Zeiträumen dieser Experimente keinen Konzentrationsabfall zeigen. Die experimentellen Zeitfenster, die hier beobachtet wurde, waren je nach Experiment zwischen 6 min und 2 h. Für diese Zeiträume wurde angenommen, dass die Zellzahl konstant ist. Für Versuche, die sich über etwa 30 min erstreckten, war diese Annahme sicherlich gerechtfertigt, da keine Bedingungen gewählt wurden, die eine direkte Zerstörung der Zellen zur Folge gehabt hätten. Über einen Zeitraum von 2 h in PBS wurden zur Überprüfung in mehreren Versuchen Zellzählungen durchgeführt und es waren keine signifikanten Änderungen festzustellen (nicht gezeigt).

Drei unabhängige Versuche wurden durchgeführt. Die Konzentrationsverläufe jedes Metaboliten wurden für jeden Versuch auf den Startwert normiert, um mögliche Unterschiede aus den vorangehenden Kulturen zu kompensieren. Für viele Metaboliten erwies sich diese Maßnahme durchaus als sinnvoll, so dass eine gute Übereinstimmung der Verläufe in den überlappenden Zeitfenstern der verschiedenen Versuche erreicht wurde. Als negatives Beispiel ist hier der Verlauf von G6P zu nennen. Während der Verlauf bis etwa 1 min keine großen Schwankungen für die unterschiedlichen Experimente zeigte, waren im weiteren Verlauf große Diskrepanzen zu erkennen. Ursache hierfür waren nicht die Konzentrationsschwankungen in diesem Zeitraum, sondern deutlich unterschiedliche Startwerte. Die gemessenen Konzentrationen im Well bewegten sich ab etwa 1 min in einem Bereich von 0-0,2 µM, wobei die Startwerte zwischen 0,3 und 0,7 µM lagen.

Deshalb führte die Normierung auf den Startwert zu einer Spreizung der folgenden Werte der verschiedenen Versuche. Als Ursache für die unterschiedlichen Startwerte ist die nicht identische Kultur zu nennen. Wie aus den Kultivierungsexperimenten gut zu erkennen war, durchläuft G6P typischerweise gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase einen starken Konzentrationsabfall (s. Abbildung 5-19). So kann ein Zeitfenster von ca. 12 h den eben genannten Konzentrationsunterschied bedingen. Zwar sind auch andere Metaboliten durch den Zustand der Kultur beeinflusst, allerdings waren diese Effekte bei diesen Metaboliten weniger stark ausgeprägt, weshalb die Normierung auf den Anfangswert für die meisten anderen gezeigten Konzentrationsverläufe gut geeignet war.

Der Konzentrationsabfall der Glykolyseintermediate bis einschließlich F16bP war ein zu erwartendes Phänomen. Nachdem keine Glucose im Überstand vorhanden war, erschien es logisch, dass die in der Glykolyse folgenden Stoffwechselprodukte nacheinander verbraucht wurden. Allerdings verhielten sich die beiden folgenden Zwischenprodukte 3PG und PEP deutlich anders. Der nach etwa 3 min eintretende Anstieg war höchstwahrscheinlich ein regulatorischer Effekt auf Metabolitebene. Als Erklärung kommt hier, wie bereits oben erwähnt, die Aktivierung der Pyruvat-Kinase durch F16bP in Frage, denn zu dem Zeitpunkt, als F16bP verbraucht war, begann die Akkumulation von 3PG und PEP. Sowohl *in vitro*, als auch für Hefen und Tumorzellen wurde dieser regulatorische Zusammenhang gezeigt [212, 303, 306, 307]. Dennoch war ein derartiger Anstieg der Konzentrationen nicht zu erwarten, da die Vorläufermetaboliten bereits sehr niedrige Konzentrationen erreicht hatten und aufgrund der Limitation theoretisch kein Fluss durch die Glykolyse mehr hätte stattfinden dürfen. Somit stellte sich die Frage, welche Quellen für die Produktion dieser Zwischenprodukte genutzt wurden. In wie weit hierfür der Abbau von endogenen Substraten wie Proteinen, Fettsäuren oder zellulärer Speicherstoffe eine Rolle spielen, kann nicht beantwortet werden. Auch die Frage, ob die Synthese von PEP und 3PG durch die für die Gluconeogenese wichtigen Enzyme Pyruvat-Carboxylase und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase erfolgte, kann basierend auf den Daten nicht geklärt werden. Neben den aufeinander folgenden Metaboliten 3PG und PEP, die beide einen Konzentrationsanstieg zeigten, war aus der Kreuzkorrelationsmatrix ein gleichartiges Verhalten von UTP und der *Energy Charge* zu erkennen. Der Konzentrationsverlauf von UTP zeigte einen Anstieg, allerdings war dieser Anstieg deutlich schwächer, als für die beiden Metaboliten PEP und 3PG. Da kein direkter Zusammenhang auf metabolischer Ebene zwischen den beiden Glykolyseintermediaten und UTP bekannt ist, wird bei diesem gleichartigen Verhalten von einer zufälligen Koinzidenz ausgegangen.

Im Verlauf der *Energy Charge* kann man einen Anstieg erkennen. Dieser Anstieg war eine Folge des Abbaus von ADP und AMP. Dies deutet an, dass die Zellen während der Limitationsperiode scheinbar keine erheblichen Schwierigkeiten bei der Energieversorgung hatten, da ansonsten ein Einbruch der *Energy Charge* zu erwarten gewesen wäre. Grund hierfür könnte sein, dass, wie bereits oben erwähnt, ein endogenes Substrat, wie z. B. Glycogen, in diesem Zeitraum abgebaut wurde. Da allerdings die Konzentrationen der Hexosephosphate sehr niedrig waren, verglichen mit dem Kontrollzustand, ist anzunehmen, dass keine große Glykolyseaktivität vorlag. Dies ist

allerdings nur ein Indiz, da ein direkter Rückschluss von der Metabolitkonzentration auf den Stofffluss nicht möglich ist.

Weiterhin könnte ein Abbau von Proteinen oder Fettsäuren stattgefunden haben, wobei aber diesbezüglich anhand der Daten keine klare Aussage getroffen werden kann. Da allerdings der Konzentrationsabfall der Intermediate des Krebszyklus im Vergleich zu den Hexosephosphaten erheblich langsamer stattfand, könnte eine länger andauernde Aktivität des Krebszyklus bestanden haben. Es könnten aus abgebauten Proteinen Aminosäuren in den Krebszyklus eingeschleust worden sein. Zusätzlich zum möglichen Katabolismus von endogenen Makromolekülen fand wahrscheinlich eine Regulation der energieverbrauchenden Reaktionen statt. Der Konzentrationsabfall der organischen Säuren fand erst nach einem anfänglichen Anstieg und in zwei Phasen statt, wobei aber die einzelnen Phasen je nach Metabolit zeitlich verschoben waren. Die Konzentration von Malat sank bereits nach etwa 0,5 min, wohingegen für Citrat der Konzentrationsabfall erst bei etwa 2 min einsetzte. Auch der zweite Konzentrationsabfall war für Malat (bei etwa 30 min) den anderen organischen Säuren (ab etwa 50 min) vorgeschalten. Eine mögliche Erklärung für den biphasischen Konzentrationsabfall könnte eine unterschiedliche Art der Regulation sein. Während der erste Abfall höchstwahrscheinlich durch eine metabolische Regulation vermittelt wurde, könnte der zweite Abfall durch eine Regulation auf Enzymebene oder Transkriptionsebene erfolgt sein. Ursachen für die zeitliche Verschiebung der Verläufe könnte in einem sequenziellen Abbau der Metaboliten liegen. Des Weiteren kann eine unkontrollierte Diffusion der organischen Säuren aus den Zellen aufgrund des Konzentrationsgradienten als Grund für das Absinken nicht ausgeschlossen werden. Allerdings erscheint dieser Effekt eher unwahrscheinlich, da aufgrund der sehr ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Moleküle ein synchroner Verlauf zu erwarten wäre. Die Konzentration von UDP-GlcNAc war über die Versuchsdauer konstant. Dies ist in sofern interessant, als dass in den vorangegangenen Versuchen eine deutliche Abhängigkeit dieser Konzentration von der Glucosekonzentration zu sehen war. Als Ursache könnte hier eine zeitliche Verzögerung in Frage kommen, was bedeutet, dass nur bei einer längeren Versuchsdauer dieser Effekt zum Tragen gekommen wäre.

Die Kreuzkorrelationsanalyse (Abbildung 5-30) zeigte zum Großteil positive Zusammenhänge auf, was auf einen kurz- bis mittelfristigen Konzentrationsabfall vieler Metaboliten zurückzuführen ist. Ein Konzentrationsabfall für Stoffwechselintermediate unter Limitationsbedingungen ist ein zu erwartendes Phänomen, da ein sequenzieller Verbrauch von Stoffwechselprodukten eines Stoffwechselweges auftreten sollte. Für jede einzelne Reaktion des Stoffwechselweges wäre ein Fortlauf der Reaktion bis zum Gleichgewicht der Reaktion zu erwarten. Da die Änderung der freien Energie für die Glykolyse von Glucose bis Lactat negativ ist [10, 11], Lactat ausgeschieden wird und somit keine Akkumulation stattfindet, können die Glykolysezwischenprodukte abgebaut werden. In ähnlicher Form würde ein Abbau anderer Stoffwechsel erwartet werden. Allerdings ist bei der Kreuzkorrelationsanalyse zu berücksichtigen, dass auch Metaboliten, welche nur einen geringen Konzentrationsabfall, welcher möglicherweise auch nicht signifikant ist, einen hohen Korrelationskoeffizienten zu Metaboliten mit einem deutlichen Konzentrationsabfall aufwiesen. Dies soll noch

einmal betonen, dass die Kreuzkorrelationsanalyse rein qualitativ ist und sehr wahrscheinlich einige Korrelationen ohne einen direkten metabolischen Zusammenhang auftraten.

Dennoch eignet sich die Korrelationsmatrix sehr gut, einen schnellen Überblick über die verschiedenen Konzentrationsverläufe zu erhalten, und wenn ein gleichartiges Verhalten durch eine gemeinsame Regulation für zwei Variablen besteht, ist dies auch in der Korrelationsmatrix zu erkennen.

Ein genereller Vergleich dieser Versuche mit der Literatur war nicht möglich, da keine Publikationen mit Experimenten unter ähnlichen Bedingungen gefunden werden konnten.

5.3.4.2 Zugabe von Medium nach Limitation

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt das Verhalten der Konzentrationen nach dem Entfernen der Substrate aus dem Überstand untersucht worden war, war es bei diesem Experiment das Ziel, die Auswirkungen der Substratzugabe auf die Metabolitkonzentrationen nach einer Limitation zu erfassen. Dazu wurden Zellen in Sechs-Well Platten bis in die späte exponentielle Wachstumsphase kultiviert. Anschließend wurde das Medium durch PBS ersetzt. Nach zwei Stunden in PBS wurde die erste Probe zur Bestimmung der intrazellulären Metaboliten genommen. Dieser Messpunkt entsprach somit dem letzten Probezeitpunkt aus dem vorangehenden Versuch in Kapitel 5.3.4.1. Anschließend wurde PBS durch neues Zellkulturmedium (GMEM-Z) ersetzt und die weiteren Proben genommen. Auch für dieses Experiment wurde eine logarithmisch skalierte Zeitachse zur Darstellung gewählt, da sich auch hier herausstellte, dass die Dynamik zu Beginn des Experiments am höchsten war. Abbildung 5-31 zeigt die Verläufe der Konzentrationen einiger Metaboliten aus Glykolyse und Krebszyklus.

Die ersten drei Metaboliten der Glykolyse verhielten sich sehr ähnlich. Der erste Messwert, noch vor der Medienzugabe, lag sehr niedrig, wobei der erste Messwert nach Zugabe des Medium bereits deutlich erhöht war. Während G6P und F6P (nicht gezeigt) zwischen 0,5 min und etwa 5 min einen weiteren Anstieg zeigten, war bei F16bP bereits nach 0,5 min der höchster Wert erreicht und es folgte ein konstanter Konzentrationsverlauf bis 30 min, wonach ein minimales Abfallen der Konzentration eintrat. Für die Konzentrationen von G6P und F6P schien sich direkt nach Erreichen des Maximums bei 5 min ein leichter Abfall bis zum Ende des Experiments anzuschließen. Wie bereits in Kapitel 5.3.4.1 waren die Verläufe von 3PG und PEP (nicht gezeigt) entgegengesetzt zu den vorangehenden Metaboliten. Der erste Messpunkt (in PBS) lag relativ hoch und bereits nach 0,5 min war die Konzentration deutlich abgefallen. Dieses Niveau wurde bis zum Ende des Experiments nahezu konstant gehalten. Der Verlauf von Pyruvat erschien relativ konstant. Die Metaboliten Citrat, *cis*-Aconitat (nicht gezeigt) und Isocitrat (nicht gezeigt) verhielten sich wiederum sehr ähnlich. Der Anfangswert entsprach dem Minimum. Nach 0,5 min war ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Danach fand eine relativ rasche Konzentrationszunahme statt und es wurde ein Maximum bei etwa 10 min erreicht. Bis 20 min fiel die Konzentration wieder und ein leichter Anstieg folgte bis zum Ende des Versuchs. Für α-Ketoglutarat fand bis etwa 2 min ein leichtes Absinken der Konzentration statt, wonach sich ein deutlicher Anstieg bis 60 min anschloss. Die Konzentration von Succinat (nicht gezeigt) stieg über die ersten 1-2 min an, danach war der Verlauf

bis 10 min relativ konstant, woraufhin die Konzentration bis zum Ende des Versuchs weiter anstieg. Die Konzentrationsverläufe von Fumarat (nicht gezeigt) und Malat ähnelten auch in diesem Versuch einander stark. Zwar schien bei Fumarat vom Anfangswert bis zur ersten Probe ein leichtes Abfallen stattzufinden, was für Malat nicht zu erkennen war, aber im weiteren Verlauf fand für beide Metaboliten zuerst ein Anstieg der Konzentration bis zu einem Maximum bei etwa 5 min statt. Anschließend fielen die Konzentrationen bis bei 20 min ein lokales Minimum erreicht wurde. Daraufhin stiegen die Konzentrationen wieder bis zum Ende des Versuchs an.

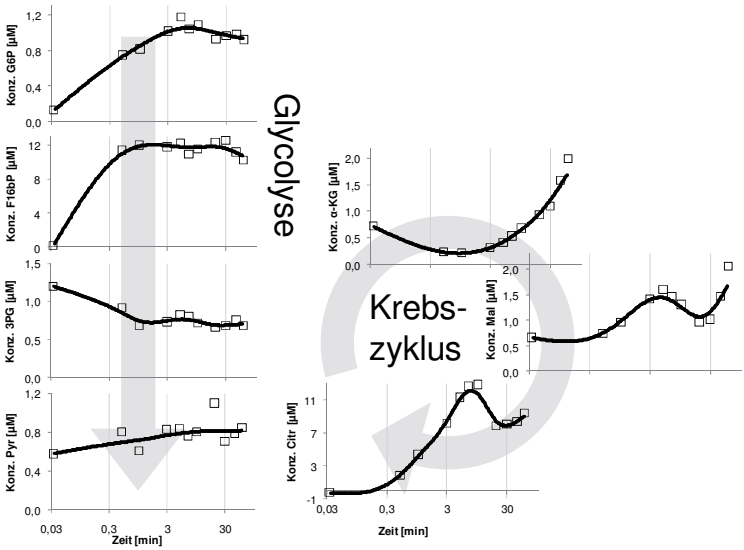


Abbildung 5-31: Verläufe von intrazellulären Metabolitkonzentrationen aus Glykolyse und Krebszyklus in MDCK-Zellen nach zweistündiger Inkubation in PBS und anschließender Zugabe von neuem Zellkulturmedium (GMEM-Z).

Aufgetragen sind Konzentrationen im Well (kein Bezug auf Zellzahl oder Zellvolumen); um eine logarithmische Darstellung zu ermöglichen, wurde der erste Messwert (direkt vor Zugabe des Mediums) auf einen Zeitpunkt t = 0,03 min positioniert.

Abbildung 5-32 zeigt die Verläufe der Konzentrationen von ATP, UDP-GlcNAc und der *Energy Charge*. Die Konzentrationsänderungen für Nukleotide und Zuckernukleotide waren geringer als für die in Abbildung 5-31 gezeigten Metaboliten. Während ATP einen leichten, gleichmäßigen Konzentrationsabfall aufwies, war bei den anderen Nukleotiden ein Anstieg der Konzentration zu verzeichnen. Für Nukleosidmonophosphate (nicht gezeigt) schien dabei in den ersten 2 min der Wert relativ konstant zu sein. Anschließend nahmen die Konzentrationen bis zum Ende des Versuchs zu. Die *Energy Charge* zeigte einen deutlichen Abfall über die Zeit.

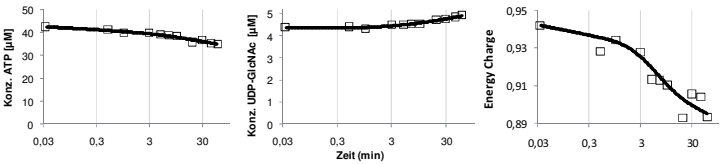


Abbildung 5-32: Verläufe der Konzentrationen von ATP und UDP-GlcNAc sowie der Energy Charge in MDCK-Zellen nach zweistündiger Inkubation in PBS und anschließender Zugabe von neuem Zellkulturmedium (GMEM-Z).

Aufgetragen sind Konzentrationen im Well (kein Bezug auf Zellzahl oder Zellvolumen); um eine logarithmische Darstellung zu ermöglichen, wurde der erste Messwert (direkt vor Zugabe des Mediums) auf einen Zeitpunkt t = 0,03 min positioniert.

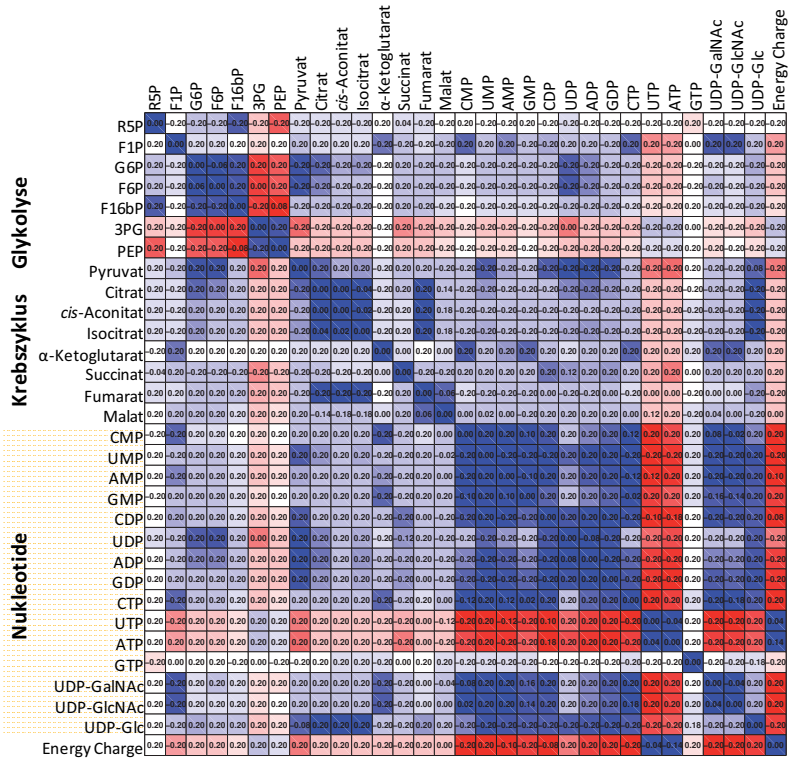


Abbildung 5-33: Kreuzkorrelationsmatrix für MDCK-Zellen nach zweistündiger Inkubation in PBS und anschließender Zugabe von neuem Zellkulturmedium (GMEM-Z).

Zur genauen Erläuterung sein auf Abbildung 5-21 verwiesen; die Zahlen in den einzelnen Feldern entsprechen dem Zeitversatz in log (min).

Grundsätzlich zeigten sich in Abbildung 5-33 ähnliche Muster wie in den Experimenten in 5.3.4.1. Einen korrelierenden Block bildeten die Zuckerphosphate, welche zum Teil auch gut korreliert waren mit der Gruppe um Citrat. Pyruvat war in diesem Experiment korreliert mit Citrat, G6P, F6P und Nukleosiddiphosphaten. Fumarat war korreliert mit Citrat, *cis*-Aconitat und Isocitrat sowie Malat. Diese beiden Metaboliten zeigten sonst nur geringe Korrelationen mit anderen Stoffwechselprodukten. 3PG und PEP waren hauptsächlich positiv miteinander korreliert, aber eine schwache positive Korrelation war auch mit ATP, UTP und der *Energy Charge* zu finden. Ansonsten waren 3PG und PEP mit den meisten anderen Metaboliten negativ korreliert, wobei diese negativen Korrelationen am stärksten zu der Gruppe der Zuckerphosphate ausgeprägt waren. α-Ketoglutarat und Succinat waren schwach mit anderen Metaboliten korreliert. Einen großen Block von korrelierenden Metaboliten stellten die Nukleotide und Zuckernukleotide. Eine Ausnahme in diesem Experiment bildete GTP, das keine stärkeren Korrelationen zu anderen Metaboliten aufwies. ATP und UTP zeigten eine starke Antikorrelation mit den restlichen Nukleotiden, waren aber positiv mit der *Energy Charge* korreliert.

Diskussion

Die Hypothese zu diesem Experiment war, dass nach dem Abfallen der Konzentrationen der intrazellulären Metaboliten während der Inkubation in PBS, durch die Zugabe von neuem Zellkulturmedium ein sequentieller Konzentrationsanstieg der unterschiedlichen Metaboliten stattfindet. Auf diese Weise sollten Einblicke in die Dynamik der Substrataufnahme bzw. des Abbaus der Substrate erzielt werden.

In diesem Experiment konnten für die meisten Metaboliten deutliche Konzentrationsänderungen gemessen werden. Auffällig bei den Verläufen in Abbildung 5-31 ist, dass der Konzentrationsanstieg von G6P langsamer erfolgte als für F16bP. Ein Grund hierfür könnte sein, dass G6P direkt zu F16bP weiterverarbeitet wird und erst dort ein metabolischer Engpass existiert, der anschließend zu einer Art Rückstau der Stoffwechselprodukte führt. Dies hieße, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Umsetzung von F16bP darstellt. Weiterhin ist der Konzentrationsabfall von 3PG im Anschluss an die Zugabe des Mediums ein interessanter Aspekt. Grundsätzlich war hier wieder ein inverses Verhalten zu Hexosephosphaten zu erkennen. Wie bereits oben erwähnt, war wahrscheinlich die Funktion von F16bP als Aktivator der Pyruvat-Kinase von entscheidender Bedeutung. Jedoch fiel hier, verglichen mit Abbildung 5-28, die Konzentrationsänderung von 3PG deutlich schwächer aus. Die Ursache für die relativ starken Schwankungen der Pyruvatkonzentration konnte nicht geklärt werden. In wie weit hier von zufälligen Schwankungen, bedingt durch Messfehler oder die biologische Variabilität, ausgegangen werden muss, oder ob hier tatsächliche starke Schwankungen der intrazellulären Pyruvatkonzentration, möglicherweise bedingt durch Oszillationen der Glykolyseintermediate [139, 308], vorlagen, wäre durch weitere Experimente und komplementäre Messverfahren zu überprüfen.

Die in Abbildung 5-31 gezeigten organischen Säuren aus dem Krebszyklus wiesen relativ starke Konzentrationszunahmen auf. Aufgrund des ähnlichen Konzentrationsverlaufs von Citrat und Malat

ist anzunehmen, dass diese Stoffwechselprodukte gemeinsam reguliert werden. Dem gegenüber verlief die Konzentration von α-Ketoglutarat deutlich anders, was wiederum darauf schließen lässt, dass zwischen diesen Stoffwechselprodukten ein regulatorisch relevanter Schritt liegen muss.

Die intrazelluläre Konzentration von ATP sank im Verlauf des Experiments um etwa 20%. Die *Energy Charge*, die direkt mit ATP verknüpft ist, sank auf einen Wert unter 0,9, was einem Wert entspricht, der unter typischen Kultivierungszuständen nur in Ausnahmen auftritt (s. Abschnitt 5.3.2.2 und 5.3.2.3). Hierfür ursächlich war nicht nur der Abfall der ATP-Konzentration, sondern ein gleichzeitig stattfindender Anstieg von ADP und AMP. Eine genauere Diskussion dieses Ergebnisses wird weiter unten im Zusammenhang mit der Literatur gegeben. Die Konzentration von UDP-GlcNAc stieg um mehr als 10% an. Grund hierfür könnte in der essentiellen Bedeutung der extrazellulären Glucosekonzentration für die intrazelluläre Konzentration der UDP aktivierten Aminohexosen liegen [95, 96].

Zahlreiche ähnliche Experimente wurden zur Untersuchung des Glucosestoffwechsels von Asziten-Tumor-Zellen durchgeführt [89, 90, 290, 303, 309]. Aber auch für andere Zelllinien wurden diverse Untersuchungen des Zentralstoffwechsels und der regulatorischen Zusammenhänge durchgeführt [88]. Bei diesen Arbeiten stand der Crabtree-Effekt im Vordergrund der Untersuchungen. Durch die Anwendung von verschiedenen Bedingungen und Stoffwechselinhibitoren wurde der Abfall der ADP- und P_i-Konzentration bzw. ein Absinken des pH-Wertes als Ursache für die verminderte Atmung nach Zugabe von Glucose ausgemacht [56, 88, 89]. Es wurde gezeigt, dass nach Zugabe von Glucose zu den Zellen ein deutlicher Konzentrationsabfall von ATP innerhalb von einer Minute stattfindet. Synchron dazu stieg ADP in seiner Konzentration deutlich an. Die zeitliche Dauer der erniedrigten Werte war allerdings für die verschiedenen Arbeiten unterschiedlich [89, 90, 290, 303, 309, 310]. Zusätzlich zu den Konzentrationsänderungen der Nukleotide war für Hexosephosphate ein erheblicher Anstieg zu verzeichnen. Die hier vorliegende Arbeit stimmt mit diesen Ergebnissen bezüglich des Konzentrationsanstieges der Hexosephosphate überein. Für Nukleotide konnten jedoch keine solch deutlichen Konzentrationsänderungen, wie in der Literatur beschrieben, gemessen werden. Als Erklärung könnte in Frage kommen, dass diese kurzzeitigen Konzentrationsänderungen durch eine zu niedrige Probenahmefrequenz nicht gemessen wurden, oder solch starke Konzentrationsänderungen unter den getesteten Bedingungen nicht auftraten. Der mittelfristige Abfall von ATP und der Anstieg von ADP und AMP, der sich im Abfall der *Energy Charge* widerspiegelte, schien ein anderes Phänomen zu sein, als die in der Literatur beschriebenen kurzzeitigen Konzentrationsänderungen innerhalb von 1-2 min. Allerdings war dieser längerfristige Abfall der *Energy Charge* auch in den ersten Stunden der Kultivierungsexperimente zu beobachten, wodurch diese Beobachtung bestätigt wurde. Bezüglich der Konzentrationsverläufe der Hexosephosphate ist besonders hervorzuheben, dass von Sussman et al. wie auch Wu und Racker ein qualitativ identisches Verhalten für G6P und F16bP gemessen wurde wie in der hier vorliegenden Arbeit [89, 90]. Dies bedeutet, dass auch in den dort untersuchten Tumorzellen der Konzentrationsanstieg von F16bP deutlich schneller erfolgte als für G6P.

Die Konzentrationen von organischen Säuren aus dem Krebszyklus wurden bei den hier erwähnten Arbeiten selten untersucht. Von Glaser et al. (1980) wurden die Konzentration von Citrat nach einer Glucosezugabe gemessen, um den regulatorischen Einfluss dieses Metaboliten auf die Aktivität der Phosphofructokinase zu untersuchen [303]. Zum Zeitpunkt der Glucosezugabe konnte kein Citrat gemessen werden und nach 5 min wurde ein klarer Konzentrationsanstieg verzeichnet. Qualitativ stimmt dies gut mit den in der hier vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen überein.

Von einer tiefergehenden Interpretation der Konzentrationsverläufe der gezeigten organischen Säuren wird hier abgesehen, da im Gegensatz zu den Zwischenprodukten der Glykolyse bei den Intermediaten des Krebszyklus eine sehr hohe Vernetzung mit anderen Stoffwechselwegen vorliegt.

Allerdings geben die gezeigten Ergebnisse einen Aufschluss über das grundsätzliche Verhalten der Metabolitkonzentrationen und durch die Kreuzkorrelationsanalyse konnten generelle Zusammenhänge zwischen Metaboliten aufgeklärt werden. Zum Teil sehr ähnliche Verläufe, insbesondere für Glykolyse- und Krebszyklusintermediate wurden für die Konzentrationen intrazellulärer Metaboliten in Hefen nach einem Glucosepuls gemessen [140, 212].

Ein interessanter Aspekt aus den gezeigten Kurzzeitexperimenten ist, dass die Versuche zur Erzeugung des Limitationszustandes (Abschnitt 5.3.4.1) und der Zugabe von Medium nach einem Limitationszustand (Abschnitt 5.3.4.2) ein sehr ähnliches Korrelationsmuster aufwiesen (s. Abbildung 5-30 und Abbildung 5-33). Eine Hypothese hierzu wäre, dass das Prinzip dieser Regulation auf metabolischer Ebene für diese beiden Versuchsszenarien identisch war. Dies würde bedeuten, dass es sich hier um eine schnelle, reversible und von den Versuchsbedingungen unabhängige Regulation handelt und durch die zweistündige Limitationsphase keine neuen Regulationsmechanismen maßgeblich beteiligt waren.

Um einen Überblick über das Korrelationsverhalten für die beiden beschriebenen Kurzzeitversuche zu geben, wurden die Korrelationskoeffizienten gemittelt und sind in Abbildung 5-34 anhand eines Schemas von Glykolyse und Krebszyklus (farbkodiert) dargestellt.

Die dunkelblau gefärbten Felder deuten Metabolitpaare an, welche ein stark korreliertes Konzentrationsverhalten zeigten. Das heißt, die entsprechenden Enzyme stellten wahrscheinlich keinen Regulationsschritt dar. Der Großteil der stark korrelierten Reaktionspartner waren bereits bei der Zusammenfassung aller Experimente durch die Korrelation ohne Zeitversatz in Abbildung 5-15 durch einen hohen Korrelationskoeffizienten charakterisiert bzw. als durch eine sehr schnelle, reversible Reaktion (Glucosephosphat-Isomerase, Aconitase, Fumarase) umgesetzte Metaboliten aus der Literatur bekannt [10, 11, 295]. Zusätzlich war für F6P und F16bP ein hoher Korrelationskoeffizient zu finden. Diese Umsetzung wird durch die Phosphofructokinase katalysiert und dieses Enzym wird allgemein als ein regulierter, irreversibler Schritt der Glykolyse beschrieben. Die Tatsache, dass F6P und F16bP für diese Experimente sehr stark korreliert waren, deutet an, dass für den beschriebenen Fall keine maßgebende Regulation von diesem Enzym ausgegangen sein kann, da scheinbar eine unmittelbare Umsetzung von F6P zu F16bP stattgefunden hat. Mögliche Effektoren dieser Reaktion sind ATP, ADP, AMP und Citrat. Während die Nukleotide für die

beiden unterschiedlichen Versuchsszenarien zu Beginn der Versuche ähnliche Konzentrationen aufwiesen, lagen für die intrazelluläre Citratkonzentration deutliche Unterschiede vor (s. Abbildung 5-28 und Abbildung 5-31). Da in beiden Versuchen aber eine hohe Aktivität der Phosphofructokinase vorgefunden wurde, scheint Citrat in der gemessenen Konzentrationsspanne keinen großen Einfluss auf die Aktivität gehabt zu haben. Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, wären allerdings weitere Experimente erforderlich.

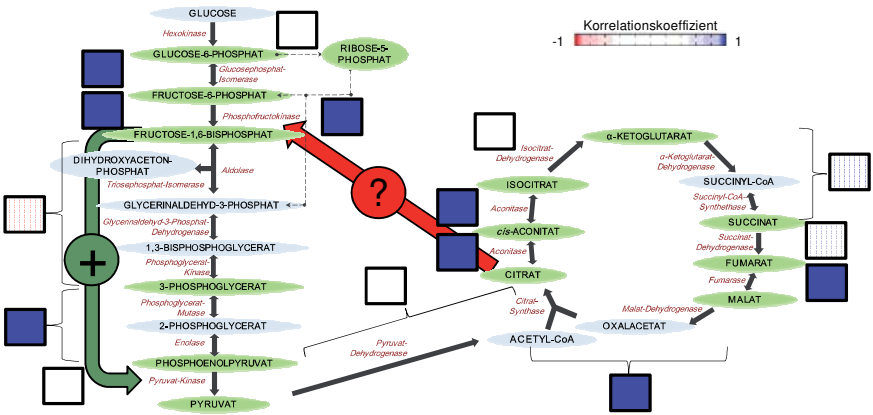


Abbildung 5-34: Schemata von Glykolyse und Krebszyklus und den farbkodierten Korrelationskoeffizienten zu den jeweiligen Metabolitpaaren für MDCK-Zellen basierend auf den Resultaten der Kurzzeitexperimente.

Dargestellt sind nur die Korrelationen zwischen aufeinanderfolgenden Metaboliten. Der grüne Pfeil deutet die Aktivierung der Pyruvat-Kinase durch F16bP an; der rote Pfeil die mögliche Inhibierung der Phosphofructokinase durch Citrat.

Weiterhin waren R5P und F16bP stark korreliert, obwohl diese beiden Metaboliten durch eine Reihe von Reaktionsschritten verbunden sind. Wie sich in der Zusammenfassung aller Experimente (Abbildung 5-15) erkennen lässt, waren R5P und F16bP in der Mehrzahl der hier durchgeführten Experimente positiv korreliert. Somit ist eine gemeinsame Regulation unter den untersuchten Bedingungen möglich. Ein weiteres, stark korrelierendes Metabolitpaar ist 3PG und PEP. Auch in der Zusammenfassung aller Experimente (Abbildung 5-15) waren diese beiden Glykolyse-intermediate positiv korreliert, wenn auch nicht sehr stark. Diese beiden Metaboliten sind über die zwei Enzyme Phosphoglycerat-Mutase und Enolase miteinander verbunden. Diese beiden Enzyme sind aus der Literatur als sehr aktiv und reversibel bekannt, so dass das hier vorgefundene Korrelationsverhalten zu erwarten war. Eine weitere positive Korrelation war für Citrat und Malat zu finden, wobei aber der Verlauf von Malat dem von Citrat in beiden Experimenten vorausging. Allerdings ist besonders hier das metabolische Netzwerk zu komplex, als dass eine Interpretation basierend auf den Daten sinnvoll erschiene.

Wie in Abbildung 5-34 zu erkennen, waren F16bP und 3PG negativ korreliert. Dies wird auf den aktivierenden Effekt von F16bP auf das Enzym Pyruvat-Kinase zurückgeführt. Als eine hohe Kon-

zentration von F16bP vorlag, war die Pyruvat-Kinase aktiv und setzte PEP (und damit auch das im Gleichgewicht befindliche 3PG) um. Nach dem Verbrauch von F16bP war die Pyruvat-Kinase inaktiv und es fand eine verminderte Umsetzung von PEP und 3PG statt, weshalb diese Metaboliten akkumulierten. Nach Zugabe von Glucose wurde innerhalb kurzer Zeit F16bP gebildet, wodurch die Pyruvat-Kinase aktiviert wurde und PEP und 3PG wieder verarbeitet wurden. Diese Beobachtungen spiegeln den bekannten Mechanismus der Regulation der Pyruvat-Kinase wider [10, 11].

5.3.4.3 Zugabe von verschiedenen Substraten nach Limitation

In diesem Experiment sollten die unmittelbaren Auswirkungen einer Zugabe der Medienzusätze Serum, Glucose und Glutamin auf die intrazellulären Metabolitpools untersucht werden. Für dieses Experiment wurden MDCK-Zellen in GMEM-Z bis in das späte exponentielle Wachstum kultiviert, anschließend wurde das Medium durch PBS ersetzt. Nach zweistündiger Inkubation wurde das PBS durch verschiedene Medien ersetzt. Vier verschiedene Medien wurden eingesetzt: DMEM, DMEM + FCS; DMEM +FCS +Glc; DMEM +FCS +Gln. Probenahmen erfolgten zu fünf Zeitpunkten, wobei der erste Punkt vor dem Austausch des Mediums durch PBS stattfand (Kontrolle) und der zweite nach der zweistündigen Inkubation in PBS (und somit dem letzten Probepunkt in 5.3.4.1 entsprach). Die Probenahmen nach Zugabe des Mediums erfolgten in logarithmisch äquidistanten Zeitschritten um die schnellen Konzentrationsänderungen der frühen Zeitpunkte besser aufzulösen. Die Verlaufskurven einiger Metabolitkonzentrationen aus Glykolyse und Krebszyklus sind in Abbildung 5-35 dargestellt.

Die Konzentration von G6P fiel innerhalb der 2 h in PBS auf einen niedrigen Wert ab (wie bereits in Kapitel 5.3.4.1 gezeigt) und stieg nach Zugabe der Medien nur im Glucose-Medium deutlich an. Die Medien, die mit Serum angereichert waren, zeigten einen minimalen Anstieg der G6P-Konzentration, was auf den geringen Gehalt an Glucose in Serum zurückzuführen ist. Ein identisches Verhalten konnte bei F6P beobachtet werden (nicht gezeigt). Die Konzentration von F16bP zeigte ebenfalls ein deutliches Absinken während der 2 h in PBS. Der Anstieg der Konzentration nach Zugabe der Medien fiel für F16bP deutlich schneller aus als für die vorangehenden Metaboliten. Für das Glucose-Medium wurde nach etwa 18 s ein Wert von etwa 12 µM erreicht. Diese Konzentration wurde bis zum Ende des Versuchs konstant gehalten. Auch in den Medien, die Serum enthielten, wurde ein Anstieg für die F16bP-Konzentration gemessen. Dieser war aber schwächer ausgeprägt, als im Glucose-Medium. Darüber hinaus war das Maximum niedriger (4 µM) und wurde erst nach 180 s erreicht. Die Konzentration von 3PG stieg während der Limitationsphase an, wie schon im Versuch in Abschnitt 5.3.4.2 im Detail gezeigt wurde. Nach Zugabe der Medien sank in allen Ansätzen die Konzentration von 3PG. Für DMEM ohne Zusatz war aber nach 18 s noch ein Anstieg der Konzentration des 3PG zu verzeichnen und erst ab 180 s begann die Konzentration zu fallen. Einen sehr ähnlichen Konzentrationsverlauf zeigte PEP (nicht dargestellt). Die Konzentration von Pyruvat wies innerhalb von 2 h in PBS einen extremen Abfall auf. Unabhängig vom Medium konnte nach der Zugabe der Medien keine stärkere Änderung der Konzentration gemessen werden.

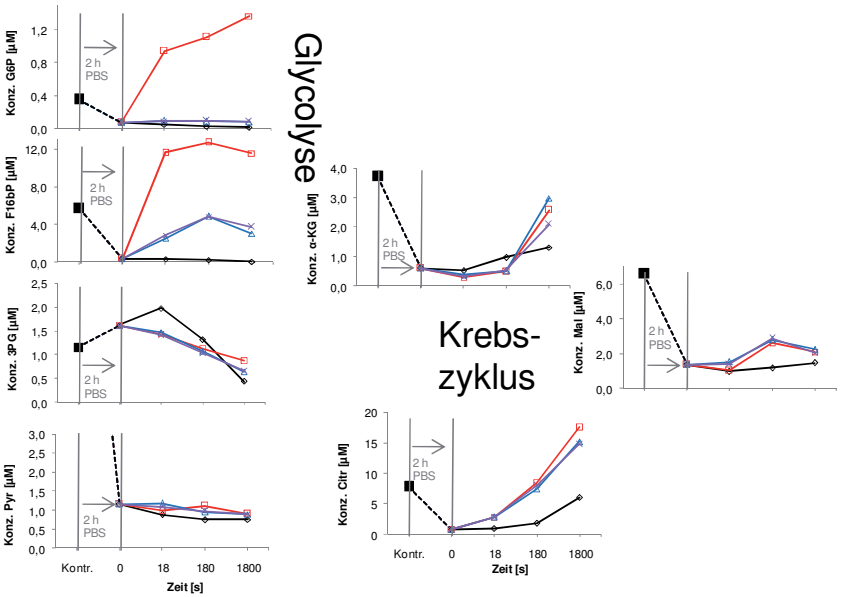


Abbildung 5-35: Konzentrationsverläufe intrazellulärer Metaboliten aus Glykolyse und Krebszyklus in MDCK-Zellen nach zweistündiger Inkubation in PBS und anschließender Zugabe von neuem Zellkulturmedium (DMEM) mit verschiedenen Supplementen.

DMEM: ◊; DMEM +FCS: ×; DMEM + FCS +Glc: □; DMEM +FCS +Gln: Δ; aufgetragen sind Konzentrationen im Well (kein Bezug auf Zellzahl oder Zellvolumen). Die Zeit nach Zugabe des Mediums ist logarithmisch dargestellt; um eine logarithmische Darstellung zu ermöglichen, wurde der Zeitpunkt t = 0 auf den Wert 1,8 s und die Kontrolle auf 0,18 s gelegt; zur besseren Visualisierung wurden die einzelnen Messpunkte mit Linien verbunden.

Für Citrat zeigte der Konzentrationsverlauf nach 2 h in PBS sein Minimum. Anschließend fand für alle Medien ein Konzentrationsanstieg statt, wobei dieser für DMEM ohne Serum deutlich schwächer ausfiel als für die anderen Medien. Für das Glucose-Medium war der Anstieg am steilsten und endete in der höchsten Konzentration (ca. 17 µM). Für α-Ketoglutarat zeigte sich in PBS ein starker Konzentrationsabfall. Nach Zugabe der Medien folgte für die serumhaltigen Medien ein konstantes Verhalten bis 180 s. Anschließend war ein erheblicher Konzentrationsanstieg zu verzeichnen, welcher am stärksten für das Medium mit Glutamin und am schwächsten für das Medium mit ausschließlich Serum ausfiel. In der Kultur in DMEM ohne Zusätze stieg die Konzentration von α-Ketoglutarat bereits nach 180 s leicht an und dieser Anstieg setzte sich bis 1800 s fort. Dies bedeutete, dass die intrazelluläre Konzentration von α-Ketoglutarat für DMEM ohne Zusätze zum Ende des Versuchs niedriger war als für die mit Serum supplementierten Medien. Die Konzentration von Malat zeigte einen erheblichen Abfall während der Inkubation in PBS. Anschließend ließen sich die Verläufe wieder für die Medien mit Serum gruppieren. In den ersten 18 s nach Zugabe des Mediums wurden nur minimale Konzentrationsänderungen gemessen. Anschließend fand bis 180 s ein Anstieg auf ein Maximum statt und bis zum Ende des Versuchs schloss sich wieder ein leichter Abfall der Konzentration an. Für DMEM ohne Zusätze war die Konzentration

von Malat nach Zugabe des Mediums relativ konstant über den untersuchten Zeitraum. Abbildung 5-36 zeigt die Konzentrationsverläufe von ATP und UDP-GlcNAc. Zusätzlich ist der Verlauf der *Energy Charge* dargestellt.

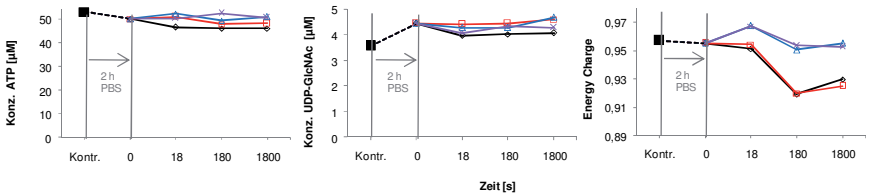


Abbildung 5-36: Verläufe der Konzentrationen von ATP und UDP-GlcNAc sowie der Energy Charge in MDCK-Zellen nach zweistündiger Inkubation in PBS und anschließender Zugabe von neuem Zellkulturmedium (DMEM) mit verschiedenen Supplementen.

DMEM: ◊; DMEM +FCS: ×; DMEM + FCS +Glc: □; DMEM +FCS +Gln: Δ; aufgetragen sind Konzentrationen im Well (kein Bezug auf Zellzahl oder Zellvolumen). Die Zeit nach Zugabe des Mediums ist logarithmisch aufgetragen; um eine logarithmische Darstellung zu ermöglichen, wurde der Zeitpunkt t = 0 auf den Wert 1,8 s und die Kontrolle auf 0,18 s gelegt; zur besseren Visualisierung wurden die einzelnen Messpunkte mit Linien verbunden.

Die ATP-Konzentration fiel während der zweistündigen Inkubation in PBS leicht ab. Anschließend war ein uneinheitliches Verhalten in den verschiedenen Medien zu erkennen. Während die ATP-Konzentration im DMEM ohne Zusätze weiterhin leicht sank, war für die anderen Medien ein vergleichsweise konstantes Verhalten zu messen. Die Konzentration von UDP-GlcNAc stieg während der Inkubation in PBS an. Nach Zugabe der Medien war für DMEM ohne Zusätze ein leichter Abfall bis 18 s zu erkennen, anschließend war die Konzentration konstant. Für das Glucose-Medium blieb die Konzentration relativ konstant über den weiteren Zeitraum. Für die beiden weiteren Medien konnte kein eindeutiges Verhalten der Konzentration von UDP-GlcNAc nachgewiesen werden. Die Verläufe der *Energy Charge* zeigten eine auffällige Gruppierung. Während die Medien mit Serum und mit Serum und Glutamin in einem relativ konstanten Wert resultierten, war für DMEM und das mit Serum und Glucose supplementierte Medium nach 180 s ein Abfall der *Energy Charge* zu verzeichnen.

Aufgrund der wenigen Datenpunkte für die einzelnen Verläufe in diesem Experiment, erschien es nicht sinnvoll, die Daten durch Splines zu interpolieren. Aus diesem Grund wurde hier keine Kreuzkorrelationsanalyse durchgeführt, sondern eine wie zuvor in Abschnitt 5.3.1 genutzte Korrelationsanalyse. Das Ergebnis ist in Abbildung 5-37 dargestellt.

Verglichen mit den vorangegangenen Versuchen waren die Korrelationen hier deutlich schwächer, was sich in der zum Großteil ungefärbten Matrix widerspiegelt. Die auftretenden Korrelationen waren die auch bereits bekannten Blöcke der Zuckerphosphate, die organischen Säuren Citrat, *cis*-Aconitat und Isocitrat bzw. Malat und Fumarat. Des Weiteren waren ADP und GDP wie auch die beiden Zuckernukleotide UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc relativ stark korreliert. Die hier genannten starken Korrelationen sind entsprechend ihrem *p*-Wert signifikant (für $p < 0{,}05$).

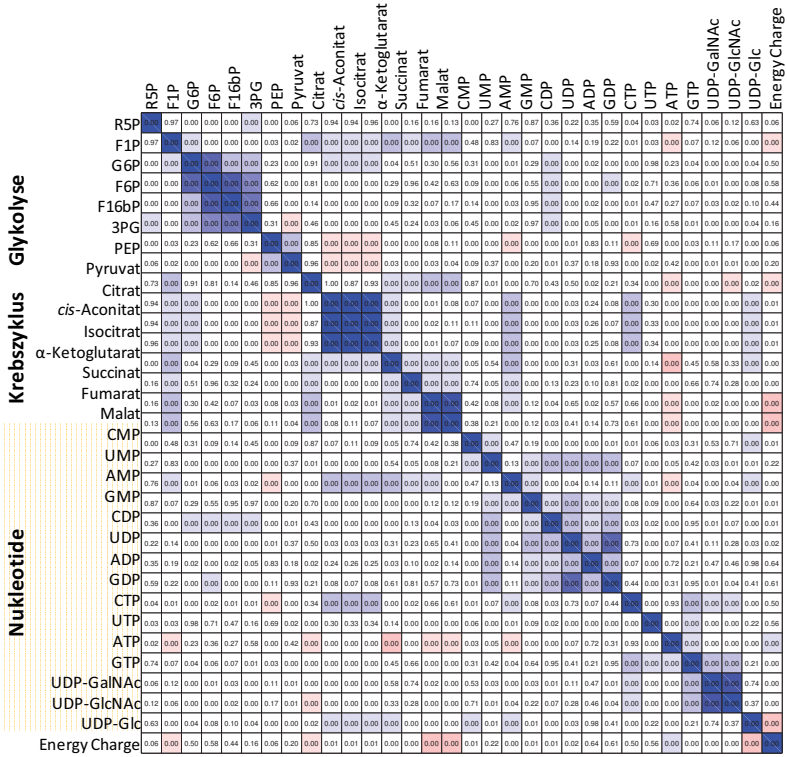


Abbildung 5-37: Korrelationsmatrix für die Metabolitkonzentrationen für MDCK-Zellen nach zweistündiger Inkubation in PBS und anschließender Zugabe von neuem Zellkulturmedium (DMEM) mit verschiedenen Supplementen.
Die Zahlen in den Feldern entsprechen dem p-Wert der entsprechenden Korrelation. Für eine weitere Erläuterung sei auf Abbildung 5-15 verwiesen.

Zusammenfassend ließ sich für die Kurzzeitexperimente ein einheitliches Muster für die Konzentrationsverläufe erkennen. Bei den Korrelationsanalysen traten durchwegs die gleichen Gruppierungen auf und die Dynamik dieser Gruppen war für die drei unterschiedlichen Versuchsbedingungen durchwegs sehr ähnlich.

Diskussion

Durch die Zugabe von Medien, welche sich nur gering unterschieden, sollten die individuellen Effekte der einzelnen Supplemente auf die intrazellulären Metabolitkonzentrationen überprüft werden. Ganz deutlich konnte der Einfluss der Glucose auf die intrazellulären Konzentrationen der Hexosephosphate nachgewiesen werden. Für die Konzentration von G6P wirkte sich die im Serum enthaltene Glucose deutlich schwächer aus als für die F16bP-Konzentration. Die Tatsache, dass allerdings nahezu keine Unterschiede in den Konzentrationsverläufen für den folgenden

Metaboliten, 3PG, für die Medien mit Serum zu erkennen waren, unterstreicht die oben erwähnte Hypothese, dass ein stark regulierter Reaktionsschritt hier involviert sein muss. Ein weiterer interessanter Aspekt wurde durch den Verlauf der Konzentration von 3PG in DMEM aufgeworfen. Zwar stieg nach Zugabe des Mediums diese Konzentration bis zum nächsten Probenahmezeitpunkt an, allerdings wurde im Anschluss ein Konzentrationsabfall gemessen. Es stellt sich die Frage, nach der Ursache dieses Abfalls. Wie bereits oben erwähnt und auch für die anderen Medien dieses Versuchs wahrscheinlich zutreffend, wurde durch die Zugabe des Mediums bzw. der Glucose in diesen Medien und dem damit einhergehende Konzentrationsanstieg von F16bP die Pyruvat-Kinase aktiviert. Dies führte zu einem Konzentrationsabfall von PEP und 3PG. Dies kann aber nicht die Ursache für den Konzentrationsabfall von 3PG in DMEM gewesen sein, da hier keine Glucose enthalten war und auch kein Konzentrationsanstieg von F16bP gemessen wurde. Eine mögliche Erklärung könnte sich aus der Betrachtung des Konzentrationsverlaufs von 3PG während der zweistündigen Inkubation in PBS ergeben (s. Abbildung 5-28). Am Ende dieses Versuchs deutete sich ein Abfall der Konzentration an. Dies würde bedeuten, dass sich dieser Abfall eventuell bei weiterer Inkubation in PBS verstärken würde. Da das Medium DMEM ohne weitere Supplemente möglicherweise eine ähnliche Limitation darstellt wie PBS, könnte auch bei Wechsel in dieses Medium ein so bedingter Abfall stattgefunden haben.

Die gezeigten Konzentrationsverläufe für organische Säuren konnten ganz klar nach dem Serumgehalt gruppiert werden. Die drei Medien, denen Serum zugesetzt wurde, wiesen sehr ähnliche Verläufe auf und es konnten keine deutlichen Unterschiede in Abhängigkeit von der Supplementierung mit Glucose oder Glutamin erkannt werden. Grundsätzlich erscheint es unwahrscheinlich, dass Glucose und Glutamin keinen Einfluss auf diese intrazellulären Metabolitkonzentrationen hatten. Allerdings könnte es der Fall sein, dass die geringen, durch Serum eingetragenen Konzentrationen von Glucose (ca. 0,5 mM) und Glutamin (ca. 0,05 mM) bereits ausreichten, um einen vergleichbaren Konzentrationsverlauf der intrazellulären organischen Säuren wie für die entsprechend supplementierten Medien, zu erzeugen. Die Konzentrationsverläufe von DMEM ohne Zugabe von Serum unterschieden sich deutlich. Der erheblich langsamere Anstieg von Citrat verglichen mit den serumhaltigen Medien war möglicherweise auf den Mangel an entweder Glucose oder Glutamin zurückzuführen. Das Gleiche traf sicherlich für die Konzentrationen von Malat zu. Eine Erklärung für die Tatsache, dass α-Ketoglutarat kurz nach Zugabe des Mediums in DMEM ohne Supplemente über den Konzentrationen lag, die in den serumhaltigen Medien gemessen wurde, kann nicht gegeben werden. Die Konzentrationsänderungen für ATP waren relativ gering. Da sich in diesem Wert auch deutlich die Zellzahlen widerspiegeln, könnten die aufgetretenen Schwankungen auch von nicht identischen Zellzahlen der verschiedenen Sechs-Well Platten herrühren. Der deutliche Unterschied für DMEM verglichen mit den anderen Medien könnte wahrscheinlich auf die fehlenden Nährstoffe zurückzuführen sein. Über die Signifikanz der niedrigeren Konzentrationen von ATP für das glucosehaltige Medium verglichen mit den beiden ebenfalls serumhaltigen Medien kann keine Aussage getroffen werden. Dennoch wurde auch bei dem vorangehenden Versuch der Mediumzugabe ein leichter Abfall der ATP-Konzentration gemessen

(s. Abbildung 5-32). Auch der Konzentrationsverlauf von UDP-GlcNAc war für die vier verschiedenen Medien relativ ähnlich. Alleine in DMEM ohne Supplemente lag scheinbar die Konzentration unterhalb der Konzentrationen in den anderen Medien. Neben den bereits oben erwähnten bekannten Inhaltsstoffen von Kälberserum sind darin noch zahlreiche nicht näher in ihrer Wirkung bekannte Moleküle enthalten. Auch dadurch könnten Unterschiede im Stoffwechsel ausgelöst worden sein.

Die *Energy Charge* wirft vor allem die Frage auf, weshalb sich die Verläufe bei Kultivierung in DMEM ohne Supplemente und DMEM mit Glucose und Serum bzw. bei den anderen beiden Medien derart ähneln. Wie bereits für das Experiment, bei welchem GMEM-Z nach der Limitationsperiode zugegeben wurde, fiel für das glucosehaltige Medium die *Energy Charge*, was die Aussagekraft dieser Ergebnisse bestärkt. Dennoch könnte der nahezu identische Verlauf für jeweils die beiden Kultivierungen, welche auf einer Sechs-Well Platte stattfanden, auf mögliche Probleme in der Durchführung der Versuche hindeuten. Da aber die Verläufe von ATP, ADP (nicht gezeigt) und AMP (nicht gezeigt) unterschiedlich waren, erscheint solch eine Erklärung als unwahrscheinlich.

Die Zusammenfassung der Experimente mit vier verschiedenen Medien in Form der Korrelationsanalyse (Abbildung 5-37) zeigte vergleichsweise wenige sehr starke Korrelationen. Eine Ursache war sicherlich, dass Kultivierungen mit stark unterschiedlichen Medien (verschiedene Substrate) gemeinsam ausgewertet wurden. Weiterhin war für diese Korrelationsanalyse kein Zeitversatz mit berücksichtigt. Grundsätzlich traten sehr ähnliche Korrelationsmuster auf wie für die Zusammenfassung aller Experimente auf (s. Abbildung 5-15). Einige Unterschiede sind dennoch zu bemerken. Insbesondere das Auftreten von negativen Korrelationen in Abbildung 5-37 ist hervorzuheben. Besonders 3PG und PEP, wie auch UTP und die *Energy Charge* fielen hier auf. Dies spiegelt letztlich die Ergebnisse aus den vorangegangenen Kurzzeitexperimenten wider, da auch dort die Metaboliten 3PG, PEP und UTP wie auch die *Energy Charge* mit zahlreichen anderen Metaboliten negativ korreliert waren.

5.3.5 Diskussion der intrazellulären Metabolitkonzentrationen für MDCK- und Vero-Zellen im Kontext der Literatur

In der hier vorliegenden Arbeit wurden intrazelluläre Metabolitkonzentrationen unter unterschiedlichsten Bedingungen gemessen. Anhand der Kultivierungen in den Medien GMEM-Z und EpiSerf konnten für Bioprozesse relevante Konzentrationsverläufe aufgenommen werden und durch die Kultivierungen in DMEM mit selektiven Energiesubstraten, wie auch durch die Kurzzeitexperimente sollte ein weiteres Auslenken der normalen Metabolitkonzentrationen zu Extremwerten erreicht werden. Wie bereits oben erwähnt, wurde bei der Optimierung der Methode darauf geachtet, dass die ermittelten Metabolitkonzentrationen in Übereinstimmung mit Literaturwerten sind. Aus diesem Grund waren in Tabelle 5-4 zellspezifische Metabolitmengen angegeben. Wie sich allerdings zeigte, sind diese Werte stark vom Kultivierungszustand abhängig. So sind z. B. für ein Medium ohne Glucose nur sehr geringe Konzentrationen der Hexose-Phosphate in MDCK-

Zellen zu erwarten. Ebenso wurde erhebliche Konzentrationsänderungen einiger Metaboliten über die Dauer einer *Batch*-Kultivierung gemessen. Ein Vergleich mit Literaturwerten ist somit nur bedingt aussagekräftig, da die genauen Kultivierungszustände nur selten angegeben sind und nur in Ausnahmen oder nur für einzelne Metaboliten zeitliche Verläufe aufgenommen wurden. Ganz besonderen Einfluss auf die gemessenen zellspezifischen Metabolitmengen hat der Zelltyp, wie sich bei dem in der hier vorliegenden Arbeit gezeigten Vergleich zwischen MDCK- und Vero-Zellen herausgestellt hat. Dennoch wurde ein Vergleich mit Literaturwerten durchgeführt. Da ein Großteil der Literatur zellspezifische Metabolitmengen beschreibt, wurden die in der hier vorliegenden Arbeit ermittelten intrazellulären Konzentrationen in zellspezifische Metabolitmengen zurückgerechnet. Für die in Tabelle 5-7 gezeigten Werte, wurden für MDCK-Zellen das Minimum und das Maximum aus den geglätteten Datenreihen für die Kultivierungen in GMEM-Z und EpiSerf ermittelt (Abschnitt 5.3.2.2; s. a. Abbildung 5-19). In den weiteren Experimenten wurden zwar zum Teil andere Extremwerte erreicht, da dies aber nicht normalen Kultivierungsbedingungen entsprach, wurden diese Werte nicht für den Vergleich herangezogen. Für Vero-Zellen wurde in gleicher Art das Minimum und das Maximum der geglätteten Werte der Kultivierung mit DMEM +Glc +Gln (Abschnitt 5.3.2.3; s. a. Abbildung 5-25) bestimmt.

Während für Nukleotide eine vergleichsweise große Menge an Vergleichsdaten zu finden war, wurden nur wenige Referenzen für organische Säuren und Intermediate der Glykolyse für gängige Produktionszelllinien gefunden. Es zeigt sich, dass tendenziell alle Metaboliten im Bereich der Werte aus der Literatur liegen. Die Literaturwerte zeigen auch, dass selbst für dieselbe Zelllinie (z. B. CHO) mitunter deutliche Unterschiede in den zellspezifischen Metabolitmengen vorzufinden waren, was wahrscheinlich auf methodische Unterschiede der verschiedenen Arbeiten zurückzuführen ist. Ein weiterer Grund hierfür könnten die Änderungen sowohl der Metabolitmengen in Zellen als auch der Zellvolumina über den Verlauf von *Batch*-Kultivierungen sein und somit die Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probenahme.

Weitere Quellen zu Metabolitmengen für aus Geweben isolierte tierische Zellen sind für insbesondere Tumor- oder Carcinoma-Zellen in der Literatur zu finden [86, 89, 90, 172-174, 290, 303, 309, 310]. Für Metabolitkonzentrationen in tierischem Gewebe sei auf die Arbeiten von Williamson und Brosnan verwiesen [311]. Eine detaillierte Erwähnung würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

Für MDCK-Zellen wurden von Nash et al. ATP-Gehalte bestimmt [313]. Zellspezifische ATP-Mengen lagen bei 10 – 25 fmol, also höher als die in der hier vorliegenden Arbeit bestimmten Mengen (ca. 6-13 fmol). Als mögliche Erklärung für diese Diskrepanz sind Unterschiede im Ursprung der Zellen, andere Kultivierungsbedingungen oder auch die Probenvorbereitung aufzuführen. Nash et al. konnten in ihrer Arbeit eine deutliche inverse Abhängigkeit des zellspezifischen ATP-Gehalts von Grad der Konfluenz (bzw. der Zelldichte) zeigen, was die grundsätzliche Tendenz, der hier vorliegenden Arbeit, nämlich die Abhängigkeit des Volumens (und somit auch des ATP-Gehaltes) von der Kultivierungsdauer widerspiegelt. Zusätzlich untersuchten. Nash et al. die Abhängigkeit des ATP-Gehaltes von der Sauerstoffversorgung, wobei mit abnehmender Sauerstoffkonzentration der ATP-Gehalt ebenfalls sank.

Tabelle 5-7: Zusammenfassung intrazellulärer spezifischer Metabolitmengen [fmol] der hier vorliegenden Arbeit im Vergleich mit ausgewählten Literaturstellen.

	vorliegende Arbeit		Literatur					
	MDCK	*Vero*	MDCK	Vero	CHO	BHK	HepG2	Hybridoma
3PG	*0,07-0,35*	*0,07-0,21*					0,738 [120]	
ADP	*0,43-1,53*	*0,40-0,73*			1-10 [281] 0,41 [171] 0,2-3 [177] 1-3 [115]	0,5-1,7 [312]	3,02 [120]	0,41-0,57 [235] 0,13-0,42 [178]
AMP	*0,04-0,35*	*0,04-0,12*			0,5-4 [281] 0,05 [171] 2-12 [177] 0,1-4 [115]	0,2-1,6 [312]	1,62 [120]	0,07-0,15 [235] 0,03-0,05 [178]
ATP	*6,46-13,16*	*4,20-7,42*	10-25 [313]	1,68-6,29 [25] 0,5-0,9 [26]	5-30 [281] 0,8-6,3 [171] 4-7 [117] 4-15 [177] 1-13 [115]	5-20 [312]	21,08 [120]	0,94-6,75 [235] 2,42-5,51 [178]
CDP	*0,01-0,07*	*0,01-0,05*			0,00 [171]			
cAco	*0,00-0,04*	*0,00-0,02*			0,16 [33] 0,1 [186]			
Citr	*0,45-3,54*	*0,45-1,93*			0,33 [33] 0,1-0,4 [186]		2,280 [120]	< 0,4-1,12 [235]
CMP	*0,03-0,13*	*0,03-0,09*			0,03 [171]			
CTP	*0,25-1,39*	*0,28-1,53*		0,26–3,39 [25]	0,05 [171] 0,5-1,4 [177] 0,51-0,85 [96] 0-1 [115]	0,43-0,88 [96]		0,4-0,79 [235] 0,22-0,92 [178] 0,63-1,17 [96]
F16bP	*0,03-4,51*	*0,79-1,34*						
F6P	*0,01-0,10*	*0,02-0,08*					*1,070* [120]	
Fum	*0,06-0,37*	*0,01-0,36*					0,495 [120]	0,65-0,95 [188]
GDP	*0,08-0,18*	*0,07-0,20*			0,01 [171] 0,2-2,5 [177]		0,41 [120]	0,04-0,08 [178]
G6P	*0,01-0,30*	*0,07-0,19*					0,965 [120]	
GMP	*0,01-0,04*	*0,79-1,34*			0,00 [171]			
GTP	*0,97-2,01*	*1,03-1,68*		2,24-8,35 [25]	0,08 [171] 0,2-2,5 [177] 0,5-3,5 [115]		3,46 [120]	0,73-1,21 [235] 0,55-1,24 [178]
Isoc	*0,01-0,10*	*0,01-0,08*						0,01-0,1 [119]
α-KG	*0,39-1,71*	*0,08-0,68*			0,1		2,020 [120]	0,1-0,3 [119]
Mal	*0,38-2,57*	*0,06-1,78*			0,5 [33] 0,55-0,85 [186]		1,110 [120]	4,5-5,8 [188] 0,35-4,5 [119]
PEP	*0,00-0,06*	*0,01-0,02*					0,333 [120]	
Pyr	*0,50-2,00*	*0,05-0,84*					17,800 [120]	0,2-0,4 [188] 0,1-0,75 [119]
R5P	*0,00-0,16*	*0,04-0,08*					0,647 [120]	
Suc	*0,11-1,28*	*0,07-0,81*			0,1-0,3 [186]		0,326 [120]	< 0,72 [188]
UMP	*0,39-1,44*	*0,15-0,43*			0,03 [171]			
UDP	*0,01-0,12*	*0,03-0,09*			0,01 [171] 0,3-1,4 [177]			
UDP-GalNAc	*0,14-0,41*	*0,28-0,46*			0,1-2,5 [177] 0,1-2 [115]	1,37-18,6 [96]		0,71-1,52 [235] 0,98-1,87 [178] 2,13-6,98 [96]
UDP-GlcNAc	*0,32-0,94*	*0,68-1,12*			1-9 [177] 0,2-6,5 [115]			
UDP-Glc	*0,33-1,22*	*0,43-1,03*		0,13–1,64 [25]	0,2-2 [115]	0,06-0,36 [312]		
UTP	*0,89-3,80*	*1,15-4,35*		0,32–26,6 [25]	0,13 [171] 1-3 [177] 1,35-2 [96] 0,5-5 [115]	1,21-2,47 [96]		1,26-2,88 [235] 0,54-2,31 [178] 0,98-2,78 [96]
Energy Charge	*0,86-0,97*	*0,94-0,96*		0,88-0,99 [25]	0,75-0,95 [281] 0,5-0,87 [177] 0,4-0,95 [115]	> 0,9 [312]	0,88 [120]	0,34-0,96 [235] 0,96 [178]

Der Wertebereich der hier vorliegenden Arbeit entspricht dem Bereich zwischen den Maxima bzw. Minima aus geglätteten Werten von Batch-Kultivierungen. Für MDCK-Zellen wurden die Versuche in GMEM-Z und EpiSerf und für Vero-Zellen der Versuch in DMEM +Glc +Gln verwendet. Um zellspezifische Mengen angeben zu können, erfolgte eine Rückrechnung aus den intrazellulären Konzentrationen. Für einige Literaturstellen wurden die Werte aus Diagrammen ausgelesen.

Burgener et al. bestimmten mehrere Nukleotide in einer Vero-Zellkultur in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen bzw. des Zellkulturmediums [25]. Es konnte eine klare Abhängigkeit des intrazellulären Nukleotidgehalts vom Medium gezeigt werden. Die meisten Nukleotide lagen in vergleichbaren Bereichen, wenn auch z. B. UTP-Mengen bis 26,6 fmol pro Zelle von Burgener et al. bestimmt wurden. Zum Teil wurden also erheblich höhere Werte ermittelt, als in der hier vorliegenden Arbeit. Weiterhin ist der Bereich für GTP für die Arbeit von Burgener et al. etwas höher, als der Bereich der GTP-Werte für Vero-Zellen der hier vorliegenden Arbeit. Als Erklärung für die Diskrepanzen kann auch hier wiederum der unterschiedliche Ursprung der Zellen wie auch die Probenvorbereitung aufgeführt werden. Die von El-Bacha [26] bestimmten Werte für ATP in Vero-Zellen lagen deutlich unter den in der hier vorliegenden Arbeit. Als Ursache für diese Diskrepanz werden methodische Unterschiede angenommen.

Für eine Vielzahl von weiteren Zelllinien wurden zellspezifische Nukleotidmengen im femtomolaren Bereich bestimmt. Typischerweise wurden für ATP die höchsten Mengen und für Nukleosidmonophosphate die niedrigsten Mengen bestimmt [178, 181, 226, 236, 280]. Organische Säuren wurden von Lu et al. (2003, 2005) für CHO-Zellen gemessen [33, 186]. Die zellspezifischen Werte lagen für Citrat und Malat in den unteren Bereichen der Werte die in der hier vorliegenden Arbeit gemessen wurden. *Cis*-Aconitat jedoch wurde von Lu et al vergleichsweise hoch konzentriert vorgefunden. Für Hybridoma-Zellen wurden für Malat Werte von etwa 4,5 fmol/Zelle und Fumarat 0,7 fmol/Zelle ermittelt [188]. Diese Werte liegen im selben Bereich wie die in dieser Arbeit bestimmten Metabolitwerte. Während die von Hofmann et al. [120] bestimmten Mengen für organische Säuren und Zuckerphosphate für HepG2-Zellen durchwegs höher lagen als die in der hier vorliegenden Arbeit, waren die Metabolitgehalte für einige Zuckerphosphate und Nukleotide, wie sie für HeLa-Zellen ermittelt wurden, in einem ähnlichen Wertebereich [86]. Die Werte für die *Energy Charge* für MDCK-Zellen und Vero-Zellen, wie sie in der hier vorliegenden Arbeit bestimmt wurden, waren über 0,86. Diese Werte für das Verhältnis der Adeninnukleotide stimmten gut mit der Literatur überein, auch wenn eine größere Bandbreite an Werten (ca. 0,40 – 0,99) für typische Kultivierungsbedingungen zu finden ist [25, 115, 120, 177, 178, 235, 281, 312].

In einigen der hier genannten Arbeiten wurden die Auswirkungen von verschiedenen Medien bzw. Medienzusammensetzungen auf die Nukleotidpools überprüft. Barnabe und Butler konnten für Hybridoma-Zellen eine positive Korrelation zwischen der Glucosekonzentration des Mediums und der *Energy Charge* zeigen [235]. Kochanowski et al. verglichen zwei Medien auf ihre Einflüsse auf die Glykosylierung von Interferon, wobei zusätzlich ein Zusammenhang zur *Energy Charge* untersucht wurde [115]. Für die beiden unterschiedlichen Medien wurden auch deutlich von einander abweichende Verläufe der *Energy Charge* gemessen. Eine Verallgemeinerung der Zusammenhänge zwischen *Energy Charge* und Medium scheint allerdings nicht möglich zu sein, da in der Literatur unterschiedliche Zelllinien untersucht wurden, aber davon ausgegangen werden muss, dass das Verhalten der *Energy Charge* auch vom untersuchten Organismus abhängig ist.

Auch andere Verhältnisse von Nukleotiden und Zuckernukleotiden wurden auf ihr Potenzial zur Charakterisierung von Zellkulturen während des Zellwachstums überprüft [8, 95, 96, 117, 180, 219].

Kernaussage dieser Publikationen ist, dass das Ende des exponentiellen Wachstums durch den zeitlich vorangehenden signifikanten Anstieg des Verhältnisses von NTP-Ratio / U-Ratio ([ATP]+[GTP])×[UDP-GNAc] / (([UTP]+[CTP])×[UTP])) vorhergesagt werden kann. Grundsätzlich wurden in den Versuchen der hier vorliegenden Arbeit vergleichbare Verläufe dieses Verhältnisses erzielt (nicht dargestellt). Allerdings war der Anstieg des Verhältnisses dem Ende der exponentiellen Wachstumsphase nicht oder nur minimal vorgeschaltet, so dass hier keine Vorhersage des Endes des exponentiellen Wachstums erfolgen hätte können. Als Erklärung für den Unterschied zur Literatur kann angegeben werden, dass die zitierten Arbeiten großteils mit Suspensionszelllinien arbeiteten und in der hier vorliegenden Arbeit adhärente Zellen untersucht wurden. Während das Ende des exponentiellen Wachstums bei Suspensionszellen wahrscheinlich metabolische Ursachen hat, sind adhärente Zellen schon vorher durch eine Limitation der Wachstumsfläche in ihrer maximalen spezifischen Wachstumsrate beeinträchtigt. Scheinbar wirkt sich diese Einschränkung nur gering auf das oben erwähnte Nukleotidverhältnis aus.

Eine Theorie zu dem regulatorischen Einfluss der Metaboliten UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc besagt, dass durch diese Stoffwechselprodukte der wachstumsinhibitorische Effekt von Ammonium vermittelt wird [95, 96]. So wird argumentiert, dass hohe extrazelluläre Ammoniumkonzentrationen in hohen intrazellulären Konzentrationen UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc resultieren. Diese Metaboliten wirken wachstumsinhibierend. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten aber keine direkten Zusammenhänge zwischen der Wachstumsrate und der intrazellulären Konzentration der UDP aktivierten Aminohexosen gefunden werden.

Somit zeigt sich für sowohl die spezifischen Metabolitmengen als auch für die Metabolitverhältnisse, dass mitunter deutliche Unterschiede, nicht nur zwischen verschiedenen Zelllinien, sondern auch zwischen verschiedenen Arbeiten mit gleichen Zelllinien, existieren. Grundsätzlich kann basierend auf einem Vergleich mit der Literatur keine Bewertung der systematischen Abweichung der hier etablierten Messmethode gegeben werden. Ursache hierfür ist, dass die tatsächlichen Metabolitmengen, also die wahren Werte, bisher nicht ermittelt wurden. Dies würde eine nicht invasive Methode erfordern, die eine absolute Quantifizierung erlaubt.

5.3.6 Zusammenfassung der Untersuchungen intrazellulärer Metabolitkonzentrationen

Basierend auf den in den vorangehenden Abschnitten entwickelten Methoden zur Quantifizierung von intrazellulären Stoffwechselprodukten wurden in diesem Kapitel die Konzentrationen und Konzentrationsverläufe wichtiger Metaboliten aus dem Zentralstoffwechsel unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Der Großteil dieser Versuche wurde mit MDCK-Zellen durchgeführt, einige Experimente befassten sich mit Vero-Zellen. Durch Korrelationsanalysen konnten generelle Zusammenhänge von Metabolitkonzentrationen, aber auch Zusammenhänge unter speziellen Bedingungen aufgeklärt werden. So waren z. B. Fumarat und Malat oder auch UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc unter allen getesteten Zuständen sehr stark miteinander korreliert, was auf sehr aktive Enzyme zur Umsetzung dieser Metaboliten ineinander hindeutet. Durch eine Zusammenfassung von Kultivierungsexperimenten mit MDCK-Zellen in Form einer Kreuzkorrelationsmatrix konnte

ein Überblick über das Korrelationsverhalten der gemessenen Parameter wie z. B. Zellzahl, extra- und intrazelluläre Metabolitkonzentrationen ermöglicht werden. Zuckerphosphate bildeten eine Gruppe stark korrelierender Metaboliten. Weiterhin war das gleichartige Konzentrationsverhalten von Citrat, *cis*-Aconitat und Isocitrat bzw. CTP und UTP auffällig.

Der detaillierte Vergleich von Kultivierungen von MDCK-Zellen in verschiedenen Medien (serumhaltig und serumfrei; Medium mit unterschiedlichen Substraten: Glc, Glc+Gln, Gln, Pyr) zeigte deutliche qualitative und quantitative Unterschiede in sowohl Zellwachstum als auch extra- und intrazellulären Konzentrationsverläufen. Die unterschiedliche Medienzusammensetzung resultierte somit in einem voneinander abweichenden Stoffwechsel der Zellen. Für Medien mit Glucose konnte gezeigt werden, dass die ersten Zwischenprodukte der Glykolyse, G6P, F6P und F16bP, ein qualitativ ähnliches Konzentrationsverhalten aufwiesen. Für 3PG, PEP und Pyruvat allerdings wurden hiervon deutlich unterschiedliche Konzentrationsverläufe gemessen. Dies deutet auf eine Regulation im Anschluss an die Phosphofructokinase hin. Auch für die Intermediate des Krebszyklus waren unabhängig vom Medium grundsätzlich ähnliche qualitative Tendenzen in den Verläufen zu erkennen. Allerdings waren die Konzentrationen mitunter deutlich verschieden, so schien die intrazelluläre Malatkonzentration unter anderem von der extrazellulären Glutaminkonzentration abhängig zu sein. Für den Vergleich von serumhaltigem zu serumfreien Medium war auffällig, dass einige Konzentrationsverhältnisse zwischen auf einander folgenden Metaboliten eine Abhängigkeit vom Medium zeigten, wie z. B. Succinat und Fumarat. Auch dies deutet auf einen veränderten Stoffwechsel hin. Des Weiteren waren klare Unterschiede in Abhängigkeit vom Medium für die gemessenen Zuckernukleotide und ATP zu erkennen. Auch die *Energy Charge* lag für das serumfreie Medium über den gesamten Kultivierungsverlauf über dem Wert des serumhaltigen Mediums. Grundsätzlich schien die *Energy Charge* zu Beginn der Kultivierungen (< 24 h) umso niedriger zu sein, je höher die Glucosekonzentration im Medium war. Eine Hypothese zum regulatorischen Einfluss der *Energy Charge* wäre, dass der Abbau der Glucose durch einen erhöhten Wert der *Energy Charge* verlangsamt stattfand. Die Konzentration der Zuckernukleotide zeigte eine klare Abhängigkeit von der extrazellulären Glucosekonzentration.

Um ein von der Zelllinie unabhängiges Abbild des Verhaltens intrazellulärer Metabolitkonzentrationen über einen Kultivierungsverlauf in tierischen Zellen zu erhalten, wurden Kultivierungsexperimente mit Vero-Zellen durchgeführt. Dort zeigte sich, dass ein mitunter vollkommen von MDCK-Zellen verschiedenes Verhalten vorliegt. So waren die Konzentrationen der Hexosephosphate über den Verlauf der Kultivierung in Medien mit Glucose relativ konstant. Die Konzentration von Malat erwies sich als stark abhängig von der extrazellulären Glutaminkonzentration, aber auch die Glucosekonzentration hatte einen Einfluss. Die ATP-Konzentration unterschied sich merklich in Abhängigkeit vom Wachstumssubstrat, was ein deutlicher Unterschied zu MDCK-Zellen ist. Als Gemeinsamkeit der beiden Zelllinien ist die Abhängigkeit der intrazellulären Konzentrationen der UDP aktivierten Aminohexosen von der extrazellulären Glucosekonzentration zu nennen.

Zur genaueren Charakterisierung der Dynamik des Stoffwechsels wurden mehrere Kurzzeitexperimente mit MDCK-Zellen durchgeführt, bei welchen die metabolische Reaktion auf eine schnelle Änderung des Mediums beobachtet wurde. Das Ersetzen des Zellkulturmediums durch PBS (Limitation) resultierte für die meisten Metaboliten der Glykolyse und des Krebszyklus in einem kurz- oder mittelfristigen Konzentrationsabfall. Während die Konzentration von Zuckerphosphaten sehr schnell abfiel (ab < 0,25 min), sank die Konzentration der organischen Säuren in einem zweiphasigen Prozess (ab 0,5-2 min und ab 30-60 min). Eine Ausnahme bildeten 3PG und PEP, welche einen Konzentrationsanstieg zeigten. Als Grund wird das Wegfallen der Aktivierung der Pyruvat-Kinase durch F16bP angenommen, nachdem die Konzentration von F16bP abgefallen war. Nukleotide und Zuckernukleotide waren durch den Entzug des Substrats vergleichsweise schwach in ihren Konzentrationen beeinflusst. Der Wert der *Energy Charge* zeigte im Anschluss an einen leichten Abfall innerhalb etwa der ersten Minute einen Anstieg, so dass nach etwa 3 min der Ausgangswert wieder erreicht war. Dass die *Energy Charge*, die als Indikator für den Energiezustand der Zellen gilt, konstant gehalten wurde, deutet an, dass MDCK-Zellen in der Lage sind, kurzzeitige Substratlimitationen durch eine Anpassung des Stoffwechsels zu überbrücken.

Weitere Kurzzeitexperimente untersuchten das Verhalten der intrazellulären Metabolitkonzentrationen in MDCK-Zellen, zu welchen nach einer Limitationsphase neues Zellkulturmedium zugegeben wurde. Grundsätzlich zeigten die meisten Metaboliten aus Glykolyse und Krebszyklus einen Anstieg, wobei wiederum die Konzentrationen von Hexosephosphaten schnellere Änderungen durchliefen, als die von organischen Säuren. Eine Ausnahme bildeten wiederum 3PG und PEP, die in ihrer Konzentration abfielen. Somit waren die Zusammenhänge der Konzentrationsverläufe die gleichen, wie in den Experimenten der Limitation. Der Anstieg der organischen Säuren Malat und Citrat waren wiederum biphasisch und die Konzentration von Malat lief der von Citrat voraus. Somit bestätigten diese Versuche die vorangegangenen Hypothesen zur Dynamik der intrazellulären Metabolitkonzentrationen nach Pulsexperimenten. Die *Energy Charge* fiel bis auf einen Wert von unter 0,9 ab, was wahrscheinlich die Beobachtung der Kultivierungsexperimente widerspiegelt, dass die *Energy Charge* zu Beginn der Kultivierung in Medium mit Glucose stark erniedrigt war.

Als generelles Muster der Korrelationsanalysen der Kurzzeitexperimente war eine gleichartiges Verhalten von Zuckerphosphaten zu erkennen. Weiterhin waren einige organische Säuren relativ stark miteinander korreliert. Auch zahlreiche der gemessenen Nukleotide verhielten sich ähnlich. Zum Großteil spiegelten diese Ergebnisse auch das Korrelationsverhalten für die Kultivierungsexperimente wider. Ein bedeutender Unterschied zwischen den Kultivierungsexperimenten und den Kurzzeitexperimenten war das Verhalten von 3PG und PEP. Die starken negativen Korrelationen, die in den Kurzzeitexperimenten auftraten, waren in den Kultivierungen nicht zu finden.

Somit war es mit den hier durchgeführten Versuchen möglich, eine Beschreibung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen von MDCK-Zellen unter typischen Kultivierungsbedingungen, für verschiedene Zellkulturmedien und in kurzen Zeiträumen nach dem Entfernen oder der Zugabe von Zellkulturmedium zu erhalten. Ebenso konnte der Einfluss einiger Mediumkomponenten auf die intrazellulären Metabolitkonzentrationen in Vero-Zellen beschrieben werden.

6 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Messung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen etabliert und verschiedene Zellkulturen und Kultivierungszustände anhand der intrazellulären Metabolitkonzentrationen charakterisiert.

Nach der Entwicklung einer AAC-Methode mit Leitfähigkeits- und UV-Detektion zur Trennung und Quantifizierung von mehr als 25 potentiell intrazellulär auftretenden Metaboliten, konnte anhand einer Validierung mit Standards in Wasser die gute Reproduzierbarkeit und Linearität dieser Messmethode gezeigt werden. Diese etablierte Methode wurde im weiteren Verlauf der Arbeit durch die Kopplung eines MS-Detektors erweitert, um eine bessere Auflösung der hohen Komplexität der Metabolitzusammensetzung von Proben zu erreichen. Weiterhin wurde in einem systematischen, vierstufigen Prozess, basierend auf statistischer Versuchsplanung, eine Probenvorbereitung für die Extraktion von intrazellulären Stoffwechselprodukten ausgewählt und optimiert. Anhand eines experimentellen Vergleichs von verschiedenen Methoden aus der Literatur wurden im ersten Schritt zur Optimierung der Probenvorbereitung zwei gut geeignete Methoden ausgewählt. Mit diesen Methoden konnte ATP gut extrahiert und Makromoleküle in der Probe gut abgereichert werden. Weiterhin erlaubten beide Methoden dank flüchtiger Extraktionsmittel eine Verwendung der genutzten Anionen-Austausch Chromatographieanlage. Im zweiten Schritt des Optimierungsprozesses konnte mit Hilfe eines fraktionellen faktoriellen Versuchsplans der Einfluss mehrerer potentiell relevanter Faktoren auf die Qualität der Extraktion untersucht werden. Um eine möglichst gut geeignete Probenvorbereitung für die unterschiedlichen Extraktionsverhaltensweisen der verschiedenen Metabolitklassen und Probenzusammensetzungen zu finden, wurden vier repräsentative Zielgrößen genutzt (*Nukleotidgehalt*, *Fructose-1,6-Bisphosphat-Gehalt*, *Energy Charge*, *Absorptionswert bei 280 nm*). Im dritten Schritt des Optimierungsprozesses wurde anhand dieser Zielgrößen basierend auf einem *Central Composite* Versuchsplans eine genaue Charakterisierung der beiden Probenvorbereitungsmethoden durchgeführt. Ein Optimum für die Methoden entsprechend allen Zielgrößen konnte durch die Verwendung von *Desirability*-Funktionen erreicht werden. Bei der Überprüfung der Methoden wurden Probleme bezüglich der Wiederfindungswerte für einige Metaboliten festgestellt, weshalb im letzten Schritt der Optimierung wichtige Teilschritte der beiden vorab optimierten Methoden kombiniert wurden. Die abschließend ausgewählte Probenvorbereitungsmethode konnte zuverlässig Wiederfindungswerte von nahe 100% für alle Metaboliten gewährleisten. Weiterhin waren die aus MDCK- und Vero-Zellen extrahierten zellspezifischen Metabolitmengen vergleichbar mit Literaturwerten. Eine Abschätzung der relativen Standardabweichung der Methode für die einzelnen Metaboliten aus mehrfachbestimmten Proben zeigte eine deutliche Abhängigkeit dieses Wertes vom genutzten Detektor (Leitfähigkeit: 10,2%; UV: 7,8%; MS: 14,0%). Für die meisten Metaboliten war die relative Standardabweichung über den untersuchten Messbereich konstant. Somit konnte eine zuverlässige Methode zur simultanen Bestimmung von etwa 30 intrazellulären Stoffwechselprodukten aus adhärenten tierischen Zellkulturen etabliert werden.

Die Beobachtung, dass MDCK-Zellen während einer typischen *Batch*-Kultivierung deutliche Volumenänderungen durchlaufen, machte es erforderlich, das Volumen durch Bestimmung des Zelldurchmessers nach Trypsinierung abzuschätzen. Durch den Bezug der gemessenen Metabolitmengen pro Zelle auf das so ermittelte Volumen pro Zelle konnten im weiteren Verlauf intrazelluläre Metabolitkonzentrationen bestimmt werden.

Mit der entwickelten Methode zur Bestimmung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen wurden verschiedene Kultivierungszustände von MDCK- und Vero-Zellen untersucht. Um generelle Zusammenhänge zwischen intrazellulären Metabolitkonzentrationen aufzuklären, wurde eine Korrelationsanalyse der gemessenen Werte aus verschiedensten Versuchen durchgeführt. Unter allen untersuchten Zuständen zeigten nur einige Metaboliten sehr starke Korrelationen (Korrelationskoeffizient > 0,9; G6P und F6P; Citrat und *cis*-Aconitat; Malat und Fumarat; ADP und GDP, ATP und GTP; UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc). Dieses gleichartige Konzentrationsverhalten kann mit generell sehr aktiven Enzymen, die diese Metaboliten ineinander umsetzen, begründet werden.

Eine deutlich größere Anzahl von hohen Korrelationskoeffizienten wurde für eine Zusammenfassung von Kultivierungsexperimenten nur mit MDCK-Zellen vorgefunden. Der Kreuzkorrelationsmatrix (Mittelwert der Kreuzkorrelationsanalysen der einzelnen Experimente) entsprechend, waren jeweils Zuckerphosphate, organische Säuren und einige Nukleotide untereinander sehr stark korreliert. Auffällig gering korreliert waren die Metaboliten 3-Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat und Pyruvat, was auf einen je nach Kultivierung unterschiedlichen Konzentrationsverlauf hindeutet. Bestätigt wurden diese Beobachtungen durch eine detaillierte Auswertung der zeitlichen Verläufe von einzelnen Kultivierungsexperimenten.

Ein Vergleich von Kultivierungen in zwei verschiedenen Medien (GMEM-Z und EpiSerf) legte sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede in den Konzentrationsverläufen intrazellulärer Metaboliten offen, obwohl beide Medien sehr gutes Zellwachstum garantierten. Die auffälligsten qualitativen Unterschiede traten für Pyruvat und ATP auf. Aber auch für Phosphoenolpyruvat, α-Ketoglutarat, GDP, GTP, UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc wurden deutlich unterschiedliche Korrelationsverhalten für die beiden verschiedenen Medien gefunden. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung beider Medien konnten jedoch keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Ursachen des unterschiedlichen Metabolismus gezogen werden. Aus diesem Grund wurde eine genauere Untersuchung von verschiedenen Wachstumssubstraten (Glc, Gln, Pyr) in Kultivierungsexperimenten durchgeführt. Hierbei zeigte das Zellwachstum eine deutliche Abhängigkeit von der Nährstoffquelle. Je nach Substrat unterschieden sich die intrazellulären Metabolitkonzentrationen mitunter erheblich. Insbesondere die intrazellulären Konzentrationen von Zuckerphosphaten, aber auch Zuckernukleotiden waren deutlich erniedrigt bei Glucoselimitation. Weiterhin wirkte sich die extrazelluläre Glutaminkonzentration positiv auf die intrazelluläre Malatkonzentration aus.

Die Dynamik des Zentralstoffwechsels und die damit verbundene metabolische Regulation wurden in Kurzzeitexperimenten untersucht. Hierfür wurde Zellen entweder die Nährstoffquelle entzogen,

oder es wurde nach einer Limitation Substrat zugegeben. Deutlich konnten unterschiedlich schnelle Antworten der verschiedenen intrazellulären Metabolitkonzentrationen auf die veränderten Bedingungen beobachtet werden. Die schnellste Konzentrationsänderung durchlief Glucose-6-Phosphat. Bereits nach wenigen Sekunden wurde ein leichter Konzentrationsabfall gemessen. Für alle Kurzzeitexperimente waren die Konzentrationsverläufe der Zuckerphosphate stark positiv untereinander korreliert, wohingegen 3-Phosphoglycerat und Phosphoenolpyruvat negativ mit den Zuckerphosphaten korreliert waren. Dieses Verhalten kann durch die Aktivierung der Pyruvat-Kinase durch Fructose-1,6-Bisphosphat erklärt werden.

Die meisten organischen Säuren aus dem Krebszyklus zeigten ein biphasisches Verhalten als Antwort auf die Veränderungen im Zellkulturüberstand. Dies deutet auf eine Regulation auf zwei Ebenen hin. Der Großteil der Nukleotide war von den veränderten Umständen unbeeinflusst. Dies lässt im Fall der Limitation der Nährstoffe auf eine schnelle Regulation des Stoffwechsels schließen, da eine Kompensation der fehlenden Nährstoffe für die Zellen möglich war.

Kultivierungsexperimente mit Vero-Zellen zeigten, dass die etablierte Methode zur Analyse von intrazellulären Stoffwechselprodukten generell für adhärente Zellen anwendbar ist. Beim Vergleich von intrazellulären Metabolitkonzentrationen während *Batch*-Kultivierungen für MDCK- und Vero-Zellen waren deutliche Unterschiede in den Konzentrationsverläufen zu erkennen, was auf einen erheblich voneinander abweichenden Stoffwechsel hindeutet.

Somit konnte diese Arbeit einen wichtigen Schritt zur weiteren Aufklärung des Stoffwechsels von kultivierten tierischen Zellen leisten. Eine verlässliche Methode zur Quantifizierung der Stoffwechselprodukte des Zentralstoffwechsels wurde etabliert und das Konzentrationsverhalten von 30 intrazellulären Metaboliten wurde unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen aufgeklärt. Zusammenhänge zwischen Metaboliten konnten aufgezeigt werden und basierend auf diesen Ergebnissen wurden erste Rückschlüsse auf die Regulation gezogen.

Der Vorteil dieser auf der Analyse von intrazellulären Stoffwechselprodukten basierenden Methode liegt im Gegensatz zu Untersuchungen des Genoms oder Proteoms darin, dass eine direkte Quantifizierung der Endprodukte biochemischer und molekularbiologischer Prozesse erfolgt. Auf diese Weise sind in diesen konkreten Messgrößen sämtliche Effekte aller regulatorischer Ebenen berücksichtigt und man erhält einen für jeden Zustand individuellen, einzigartigen Metabolit-Fingerabdruck.

7 Ausblick

Basierend auf der in dieser Arbeit erfolgreich etablierten analytischen Methode und den damit generierten Daten zur Charakterisierung von MDCK- und Vero-Zellen wären diverse fortführende Versuche denkbar. Grundlegend wäre eine weitergehende Aufklärung der Einflüsse des Zellkulturmediums auf die intrazellulären Stoffwechselproduktkonzentrationen äußerst interessant. Durch eine systematische Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Medienzusammensetzung, Zellwachstum und intrazellulären Metabolitkonzentrationen in Kultivierungsexperimenten wäre mittelfristig ein rationaler Ansatz der Medienentwicklung oder Prozessentwicklung basierend auf Markern in Form von Metabolitkonzentrationen oder Metabolitverhältnissen vorstellbar [117, 219].

Eine weitere Untersuchung in Form von Kurzzeitexperimenten könnte erfolgen. Eine verlängerte Limitationsperiode der Zellen (> 2 h) könnte aufklären, wie lange eine Kompensation des Nähstoffmangels aufrecht gehalten werden kann. Bei zusätzlicher Messung der Abbauprodukte im Zellkulturüberstand könnten Rückschlüsse gezogen werden, ob und wenn ja, welche intrazellulären Makromoleküle während einer Limitationsperiode zur Kompensation des Nähstoffmangels im Zellkulturüberstand abgebaut werden. Im Falle von Pulsexperimenten sollten nur einzelne Substrate zum Einsatz kommen und auf Serum verzichtet werden. Auf diese Weise könnten eindeutige Zusammenhänge zwischen Mediuminhaltsstoffen und einzelnen intrazellulären Metabolitkonzentrationen gefunden werden. Weitere Kurzzeitexperimente könnten dazu dienen, die Aktivität einiger Enzyme *in vivo* zu ermitteln. Dazu wäre aber auch die zusätzliche Messung der extrazellulären Konzentrationsänderungen der entsprechenden Substrate und Abbauprodukte erforderlich. Um die geringen Konzentrationsänderungen im Zellkulturüberstand messen zu können, müsste hierbei wahrscheinlich eine Messmethode mit einer höheren Sensitivität und niedrigen Bestimmungsgrenzen zum Einsatz kommen, als das im Verlauf dieser Arbeit verwendete Gerät Bioprofile Plus. Darüber hinaus wäre für solche Studien auch der Einsatz von spezifischen Enzyminhibitoren denkbar. Da auf diese Weise eine Weiterreaktion der Stoffwechselprodukte an definierten Stellen des Metabolismus verhindert würde, wäre eine Bilanzierung möglich ohne die Abbauprodukte des vollständigen Stoffwechsels zu messen. Auf diese Weise könnten weitere wichtige Parameter für eine kinetische Modellierung des Zentralstoffwechsels geschätzt werden.

Aus den in dieser Arbeit gezeigten Konzentrationsänderungen verschiedener Metaboliten im Verlauf einer Kultivierung kann geschlossen werden, dass sich auch die Regulation verschiedener Stoffwechselwege ändert. Bei Kenntnis der Metabolitkonzentrationen und Enzymaktivitäten zu verschiedenen Zeitpunkten bestünde die Möglichkeit über die Methode der Metabolischen Kontrollanalyse [112, 113] die flusskontrollierenden Reaktionsschritte in Abhängigkeit vom Kulturzustand zu identifizieren.

Eine weitere Möglichkeit zur Fortführung der Experimente böte sich in der Untersuchung von dynamischen Kulturen. Da die üblicherweise in der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik für die Kultivierung im Bioreaktor genutzten Cytodex Mikrocarrier durch ihre positive Ladung ungeeignet sind für die Analyse von anionischen Metaboliten, wurde von Frau Christina Krämer eine

Kultivierung auf alternativen Mikrocarriern etabliert. Bei diesen Mikrocarriern (MicroHex, Nunc) handelt es sich um aus Polystyrene gefertigte, hexagonale Blättchen. Durch die Optimierung von insbesondere den Anheftungsbedingungen für MDCK-Zellen konnten mit Cytodex-Carriern vergleichbare Zellzahlen und Influenza-Virustiter erzielt werden [302]. Durch die erheblichen Unterschiede bei der Zellkultivierung in statischen und dynamischen Kulturen, sind auch klare Konzentrationsunterschiede der intrazellulären Metaboliten zu erwarten. Erste Versuche zur Probenvorbereitung mit Mikrocarriern wurden bereits durchgeführt und eine prinzipielle Anwendbarkeit konnte gezeigt werden.

Aktuelle zum Teil bereits durchgeführte Arbeiten befassen sich mit den metabolischen Auswirkungen einer Infektion von MDCK-Zellen mit Influenza-Virus in ähnlicher Form wie von Munger et al. für Cytomegaloviren bereits durchgeführt [29, 30]. Verglichen mit einer Scheininfektion konnten in einer mit Influenza-Virus infizierten Kultur nach einer anfänglichen Periode unveränderter Konzentrationen deutlich höhere Werte für Zuckerphosphate und einige organische Säuren beobachtet werden, wohingegen z. B. ATP eine erniedrigte Konzentration zeigte. Eine genauere Untersuchung von verschiedenen Virusstämmen könnte Zusammenhänge zwischen der Replikationsfähigkeit der Viren in Zellkultur, der Dynamik des Infektionsverlaufs, der Apoptose und dem Zentralstoffwechsel aufdecken. Z. B. konnte von Burgener et al. [25] ein Zusammenhang zwischen der *Energy Charge* zum Zeitpunkt der Infektion und der Produktion von Reoviren nachgewiesen werden. Aber nicht nur eine Verbindung der Infektion zu Nukleotiden, sondern auch zu Glykolyse oder Krebszyklus wäre denkbar, angesichts der Tatsache, dass die Vermehrung des Influenza-Virus eine Zerstörung der Mitochondrien zur Folge hat, wodurch der Zentralstoffwechsel wahrscheinlich stark beeinträchtigt ist. Im Zusammenhang mit diesen Versuchen könnten Inhibitoren der Zellatmung genutzt werden, um die Effekte einer Virusinfektion auf die Aktivität der Mitochondrien vergleichen zu können.

Wie schon in den gezeigten Experimenten mit Vero-Zellen, müssen mitunter erhebliche Unterschiede für verschiedene Zelllinien erwartet werden. Aus diesem Grund könnte im Zusammenhang mit einem Impfstoffherstellungsprozess eine genauere Untersuchung für Vero-Zellen stattfinden, aber auch weitere adhärente Zellen, unabhängig von ihrer Verwendung, könnten durch die in dieser Arbeit entwickelte Methode charakterisiert werden.

Mit gewissen Modifikationen wäre die Probenvorbereitung ebenso für Suspensionszellen zu verwenden, wie in ersten Versuchen mit einer aviären bzw. humanen Suspensionszelllinie gezeigt wurde. Der entscheidende Schritt wäre hier die Abtrennung der Zellen vom Zellkulturmedium. Verglichen mit adhärenten Zellen kann kein schnelles Abgießen des Mediums stattfinden, sondern eine Zentrifugation oder Filtration muss der Probenahme folgen. Da diese Verfahrensschritte allerdings sich in einem zeitlichen Rahmen von mindestens 3-5 min bewegen, findet u. U. trotz Abkühlung der Zellen auf etwa 0 °C eine weitere metabolische Aktivität statt. Insbesondere während der Zentrifugation könnten auch bei niedrigen Temperaturen Limitationen am Boden des Zentrifugationsgefäßes im Pellet auftreten. Weitere Arbeiten zur Überprüfung der Effekte durch die Zellabtrennung bzw. eine Verbesserung der aus der Literatur bekannten Methoden sollten erfolgen.

Mittelfristig wäre es wichtig, bei der Analyse der intrazellulären Metaboliten eine Trennung der verschiedenen Zellkompartimente zu erreichen. Insbesondere für Modellierungsansätze basierend auf stöchiometrischen Stoffwechselmodellen wäre eine Unterscheidung der cytosolischen und intramitochondrialen Metabolitkonzentrationen sehr wünschenswert. Allerdings ist hier zu berücksichtigen, dass Mitochondrien wiederum zwei Kompartimente besitzen und auch von keiner Homogenität der Metabolitkonzentrationen im Cytosol ausgegangen werden kann.

Eine weitere methodische Erweiterung mit großem zusätzlichen Informationsgewinn könnte die Bestimmung des Redoxverhältnisses $[NAD(P)^+] / [NAD(P)H + H^+]$ darstellen. Verschiedene Methoden könnten dafür genutzt werden. Bei zusätzlicher Bestimmung entweder der intrazellulären Lactatkonzentration oder der extrazellulären Pyruvatkonzentration (häufig wird für Lactat und Pyruvat ein Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulären Konzentrationen angenommen) könnte bei Annahme einer sehr aktiven Lactat-Dehydrogenase das Redoxverhältnis abgeschätzt werden [223]. Auch über Fluoreszenzmessungen könnte dieses Verhältnis ermittelt werden [314, 315]. Bei einer getrennten Probenvorbereitung könnte auch über eine enzymatische Bestimmung das Verhältnis $[NAD(P)^+] / [NAD(P)H + H^+]$ ermittelt werden [234]. Aufgrund des enormen Einflusses dieses Metabolitverhältnisses auf den gesamten Stoffwechsel [10, 11] wäre der Aufwand einer weiteren Methodenentwicklung wahrscheinlich gerechtfertigt.

Fortführende Arbeiten zur Identifikation von weiteren Metaboliten wären denkbar. Bei Nutzung einer komplementären Chromatographiemethode (z. B. GC-MS, rpHPLC-MS) könnten wahrscheinlich weitere Stoffwechselprodukte quantifiziert werden. Basierend auf diesen Daten könnte eine Überarbeitung des Stoffwechselnetzwerkes stattfinden.

Basierend auf der in dieser Arbeit entwickelten Methode zur Probenvorbereitung für die Messung intrazellulärer Stoffwechselprodukte wäre eine ^{13}C-Stoffflussanalyse möglich [118]. Dazu müssten Versuche mit isotopenmarkiertem Substrat durchgeführt werden. Nach der Probenvorbereitung würde eine Messung der Proben entweder mit einer LC-MS oder GC-MS Methode stattfinden, um die Isotopenverteilung für die einzelnen Metaboliten aufzuklären. Auf diese Weise könnte die Flussverteilung genauer bestimmt werden, als dies in den bereits durchgeführten Arbeiten basierend auf ausschließlich extrazellulären Daten der Fall war [22, 23]. Die prinzipielle Eignung der Probenvorbereitung für eine GC-MS Messung konnte in einigen Vorversuchen bereits demonstriert werden.

Besonders interessant wäre sicherlich eine Kombination der in dieser Arbeit genutzten Bestimmung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen mit Messungen des Proteoms, der Enzymaktivität oder auch des Transkriptoms [140], da solche Arbeiten bereits in der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik durchgeführt werden. Eine Aufklärung der Zeitskalen bzw. der Hierarchie von Regulationsmechanismen könnte so erreicht werden. Bei genauerer Untersuchung der Regulation wäre u. U. auch eine Beschreibung der Zusammenhänge in Form von mathematischen Modellen denkbar, vergleichbar mit Arbeiten zu Prokaryonten [316]. Somit bietet die hier durchgeführte Arbeit eine aussichtsreiche Grundlage für zahlreiche weitere, interessante Forschungsarbeiten.

Verzeichnisse

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Schema des Zellwachstums von adhärenten Zellen in (A) bei linearer Darstellung der Zellzahl und (B) bei logarithmischer Auftragung. 8

Abbildung 3-2: Schema wichtiger Stoffwechselwege des Zentralstoffwechsels für tierische Zellen in Kultur. 10

Abbildung 3-3: Schema für den Ablauf einer typischen Probevorbereitung für die Bestimmung von intrazellulären Stoffwechselprodukten in kultivierten tierischen Zellen; für jeden Schritt existieren mehrere mögliche Behandlungsmethoden.... 24

Abbildung 3-4: Darstellung der Faktoreinstellungen für die vier durchzuführenden Versuche bei einem 2-Faktor-2-Level faktoriellen Experiment. (A) Graphisch; (B) Design Matrix. 28

Abbildung 3-5: Graphische Darstellung der zwei halben Fraktionen eines 2^3 faktoriellen Versuchsplans (A); tabellarische Form mit den Kontrastkoeffizienten (Plus- und Minuszeichen) für die acht Experimente eines 2^3 Versuchsplans (B). 31

Abbildung 3-6: Graphische Darstellung eines Central Composite Versuchsplans mit zwei Faktoren x_1 und x_2;.... 33

Abbildung 3-7: Graphische Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten der Gewichtung der Zielgrößen durch den Exponenten κ für zu maximierende (A) und zu minimierende (B) Zielgrößen. 34

Abbildung 3-8: Schematische Darstellung der zeitlichen Verschiebung von Verlaufskurven für die Verwendung im Rahmen der Kreuzkorrelation. 36

Abbildung 5-1: Gradientenprogramme und entsprechende Chromatogramme einer Standardmischung* für die Anlage DX320.... 53

Abbildung 5-2: Einfluss des pH-Wertes der Probe auf die relativen Peakflächen in Chromatogrammen 55

Abbildung 5-3: Darstellung eines repräsentativen Chromatogramms des Leitfähigkeitskanals einer Extraktionsprobe mit den in mehreren Extraktionsproben auftretenden m/z-Fragmenten. 57

Abbildung 5-4: Standardabweichung (A) und relative Standardabweichung (B) für die Metaboliten ATP (gemessen per UV-Detektion) und Pyruvat (gemessen per MS-Detektion) über die Konzentration im Standard. 60

Abbildung 5-5: Gradientenprogramme und entsprechende Chromatogramme der gepulsten amperometrischen Detektion der jeweils aktuellen Standardmischung* für die Anlage DX600. 62

Abbildung 5-6: Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden zur Bestimmung intrazellulärer Metaboliten aus MDCK-Zellen in Sechs-Well Platten bezüglich (A) Absorption bei 280 nm; (B) Relativer ATP-Gehalt pro Zelle. 70

Abbildung 5-7: Schema zur Optimierung der Methoden „MeOH/Kochen“ (A) und „MeOH/$CHCl_3$“ (B) mit den kritischen Schritten, die genauer untersucht wurden. 72

Abbildung 5-8: Optimierung der Methoden „MeOH/Kochen“ (A) und „MeOH/$CHCl_3$“ (B) gemäß der fraktionellen faktoriellen Versuchspläne mit Hilfe des Prediction Profilers (s. a. Tabelle 4-3). 73

Abbildung 5-9: Optimierung der Methoden „MeOH/Kochen“ (A) und „MeOH/$CHCl_3$“ (B) gemäß des Central Composite Versuchsplans mit Hilfe des Prediction Profiler (s. a. Tabelle 4-4). 76

Abbildung 5-10: Vergleich der beiden Extraktionsmethoden für MDCK-Zellen (A) und Vero-Zellen (B) für die verschiedenen Metaboliten, den Nukleotidgehalt, die Absorption 280 nm und die Energy Charge. 80

Abbildung 5-11: Schema der abschließend genutzten Methode der Probenvorbereitung nach den erforderlichen Modifikationen zur Vermeidung enzymatischer Aktivitäten.... 82

Abbildung 5-12: Beispielhafter Verlauf des mittleren Zelldurchmessers von MDCK-Zellen nach Beginn der Trypsinierung (A) und während der Kultivierung in Sechs-Well Platten in GMEM-Z (B) 86

Abbildung 5-13: Histogramme für Zellvolumina zu den Zeitpunkten 7 h, 30 h und 55 h nach Zelleinsaat für zwei unterschiedliche Methoden der Bestimmung: Adhärente Zellen mikroskopisch (schwarz) und trypsinierte Zellen mittels ViCell XR (rot). 87

Abbildung 5-14: Streudiagramme für die jeweils gleichzeitig gemessenen Konzentrationen von (A): Citrat und cis-Aconitat und (B): Pyruvat und F16bP. 101

Abbildung 5-15: Korrelationsmatrix für die Konzentrationen intrazellulärer Metaboliten und der Energy Charge basierend auf den Einzelmessungen aller Experimente. 102

Abbildung 5-16: Kreuzkorrelationsmatrix für die Zusammenfassung der einzelnen Kreuzkorrelationsanalysen für verschiedene Kultivierungen mit MDCK-Zellen 106

Abbildung 5-17: Schemata von Glykolyse und Krebszyklus und den farbkodierten Korrelationskoeffizienten zu den jeweiligen Metabolitpaaren für Kultivierungen von MDCK-Zellen. 109

Abbildung 5-18: Verläufe der Zellzahl (A) des Gesamtzellvolumens (B) für die zwei Medien GMEM-Z (schwarz) und EpiSerf (rot). 112

Abbildung 5-19: Verläufe von extra- und intrazellulären Metabolitkonzentrationen bei Kultivierung von MDCK-Zellen in GMEM-Z (schwarz) und EpiSerf (rot). 116

Abbildung 5-20: Verläufe der intrazellulären Konzentrationen ausgewählter Nukleotide und der Energy Charge bei Kultivierung von MDCK-Zellen in GMEM-Z (schwarz) und EpiSerf (rot). 122

Abbildung 5-21: Kreuzkorrelationsmatrix für Kultivierungen von MDCK-Zellen in GMEM-Z. 129

Abbildung 5-22: Kreuzkorrelationsmatrix für Kultivierungen von MDCK-Zellen in EpiSerf. 131

Abbildung 5-23: Darstellung der Differenzen der Korrelationen zwischen den Medien GMEM-Z und EpiSerf. 132

Abbildung 5-24: Verläufe der Zellzahlen (A) und Zusammenfassung der Startzellzahlen, der maximalen spezifischen Wachstumsraten und maximalen Zellzahlen (B) bei Kultivierungen von MDCK-Zellen in DMEM mit vier verschiedenen Wachstumssubstraten. 135

Abbildung 5-25: Verläufe von extra- und intrazellulären Metabolitkonzentrationen bei Kultivierung von MDCK-Zellen in DMEM mit vier verschiedenen Wachstumssubstraten.. 136

Abbildung 5-26: Verläufe der intrazellulären Konzentrationen von ATP, UDP-GlcNAc und der Energy Charge bei Kultivierung von MDCK-Zellen in DMEM mit vier verschiedenen Wachstumssubstraten.137

Abbildung 5-27: Verläufe von Zellzahl, intrazellulären Metabolitkonzentrationen und der Energy Charge bei Kultivierung von Vero-Zellen in DMEM mit vier verschiedenen Wachstumssubstraten. 144

Abbildung 5-28: Konzentrationsverläufe intrazellulärer Metaboliten aus Glykolyse und Krebszyklus in MDCK-Zellen in einem Zeitraum von 2 h nach dem Ersetzen des Zellkulturmediums durch PBS..... 148

Abbildung 5-29: Verläufe der intrazellulären Konzentrationen von ATP und UDP-GlcNAc sowie der Energy Charge in MDCK-Zellen in einem Zeitraum von 2 h nach dem Ersetzen des Zellkulturmediums durch PBS. 149

Abbildung 5-30: Kreuzkorrelationsmatrix für MDCK-Zellen nach dem Ersetzen des Zellkulturmediums durch PBS. 150

Abbildung 5-31: Verläufe von intrazellulären Metabolitkonzentrationen aus Glykolyse und Krebszyklus in MDCK-Zellen nach zweistündiger Inkubation in PBS und anschließender Zugabe von neuem Zellkulturmedium (GMEM-Z). 155

Abbildung 5-32: Verläufe der Konzentrationen von ATP und UDP-GlcNAc sowie der Energy Charge in MDCK-Zellen nach zweistündiger Inkubation in PBS und anschließender Zugabe von neuem Zellkulturmedium (GMEM-Z). 156

Abbildung 5-33: Kreuzkorrelationsmatrix für MDCK-Zellen nach zweistündiger Inkubation in PBS und anschließender Zugabe von neuem Zellkulturmedium (GMEM-Z). 156

Abbildung 5-34: Schemata von Glykolyse und Krebszyklus und den farbkodierten Korrelationskoeffizienten zu den jeweiligen Metabolitpaaren für MDCK-Zellen basierend auf den Resultaten der Kurzzeitexperimente. 160

Abbildung 5-35: Konzentrationsverläufe intrazellulärer Metaboliten aus Glykolyse und Krebszyklus in MDCK-Zellen nach zweistündiger Inkubation in PBS und anschließender Zugabe von neuem Zellkulturmedium (DMEM) mit verschiedenen Supplementen. 162

Abbildung 5-36: Verläufe der Konzentrationen von ATP und UDP-GlcNAc sowie der Energy Charge in MDCK-Zellen nach zweistündiger Inkubation in PBS und anschließender Zugabe von neuem Zellkulturmedium (DMEM) mit verschiedenen Supplementen. 163

Abbildung 5-37: Korrelationsmatrix für die Metabolitkonzentrationen für MDCK-Zellen nach zweistündiger Inkubation in PBS und anschließender Zugabe von neuem Zellkulturmedium (DMEM) mit verschiedenen Supplementen. 164

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Exemplarische Tabelle für die Varianzanalyse (ANOVA) für einen Versuch mit einem fixen (kontrollierten) Faktor. 30

Tabelle 3-2: Schematischer Aufbau einer Korrelationsmatrix. 35

Tabelle 4-1**:** Validierte Messbereiche und relative Verfahrensstandardabweichung für das Gerät Bioprofile für die mit diesem Geräte quantifizierten extrazellulären Metaboliten (Validierungsmessungen vom 13.06.2006). 40

Tabelle 4-2**:** Erläuterung der verschiedenen Angaben zu Metabolitmengen und -konzentrationen 42

Tabelle 4-3**:** Zusammenfassung der Faktoren und Niveaus (Level) für die fraktionellen faktoriellen Versuchspläne zur Optimierung der Methoden MeOH/Kochen (A) und MeOH/$CHCl_3$ (B) 45

Tabelle 4-4**:** Zusammenfassung der Faktoren und Niveaus (Level) +1 und -1 für den Central Composite Versuchsplan zur Optimierung der Methoden MeOH/Kochen (1. Experiment: (A); 2. Experiment: (B)) und MeOH/$CHCl_3$ (C). 46

Tabelle 5-1**:** Zusammenfassung der chromatographisch untersuchten Metaboliten (Trennung mittels des verbesserten Gradienten; s. Abbildung 5-1) 51

Tabelle 5-2**:** Zusammenfassung der mittels SIM-Kanal detektierten Metaboliten mit den entsprechenden charakteristischen m/z-Fragmenten, den entsprechenden chromatographischen Zeitfenstern und den für den MS-Detektor verwendeten Konusspannungen. 59

Tabelle 5-3**:** Zusammenfassung der Analyse der relativen Standardabweichungen (%) für die drei Detektoren der Chromatographieanlage DX320 und die acht genutzten Standardverdünnungen. 61

Tabelle 5-4**:** Vergleich der beiden optimierten Extraktionsmethoden bezüglich Metabolitgehalt pro Zelle und Wiederfindung für MDCK- (A) und Vero- (B) Zellen und zusätzlich der im weiteren Verlauf der Arbeit genutzten, finalen Methode („MeOH/$CHCl_3$/Kochen“, s. Abschnitt 5.2.4) für MDCK-Zellen. 79

Tabelle 5-5**:** Zusammenfassung der Analyse der relativen Standardabweichungen (%) für mehrfach bestimmte Extraktionsproben in Abhängigkeit von der Konzentrationsklasse bzw. des Detektors 84

Tabelle 5-6**:** Zusammenfassung der Verhältnisse von Produkten zu Edukten des Energiestoffwechsels für das Zellwachstum von MDCK-Zellen in Sechs-Well Platten in GMEM-Z bzw. EpiSerf 117

Tabelle 5-7**:** Zusammenfassung intrazellulärer spezifischer Metabolitmengen [fmol] der hier vorliegenden Arbeit im Vergleich mit ausgewählten Literaturstellen. 168

Literaturverzeichnis

[1] Freshney RI. 1994. Culture of animal cells a manual of basic technique. New York: Wiley-Liss. 486 p.

[2] Kretzmer G. 2002. Industrial processes with animal cells. Applied Microbiology and Biotechnology 59(2-3):135-42.

[3] Spier RE. 2000. History of Animal Cell Technology. In: Spier RE, editor. Encylopedia of cell technology. New York: Wiley. p 853-872.

[4] Merten OW. 2006. Introduction to animal cell culture technology-past, present and future. Cytotechnology 50(1-3):1-7.

[5] Butler M. 2005. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. Applied Microbiology and Biotechnology 68(3):283-291.

[6] Wurm FM. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nature Biotechnology 22(11):1393-1398.

[7] Storhas W. 2003. Bioverfahrensentwicklung. Weinheim: Wiley-VCH. 759 p.

[8] Moore A, Mercer J, Dutina G, Donahue CJ, Bauer KD, Mather JP, Etcheverry T, Ryll T. 1997. Effects of temperature shift on cell cycle, apoptosis and nucleotide pools in CHO cell batch cultures. Cytotechnology 23(1-3):47-54.

[9] Butler M. 2006. Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. Cytotechnology 50(1-3):57-76.

[10] Lehninger AL. 1998. Prinzipien der Biochemie. Heidelberg [u.a.]: Spektrum, Akad. Verl. 1223 p.

[11] Stryer L. 1996. Biochemie. Heidelberg [u.a.]: Spektrum, Akad. Verl. 1125 p.

[12] Tree JA, Richardson C, Fooks AR, Clegg JC, Looby D. 2001. Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. Vaccine 19(25-26):3444-3450.

[13] Audsley JM, Tannock GA. 2008. Cell-based influenza vaccines: progress to date. Drugs 68(11):1483-91.

[14] Genzel Y, Behrendt I, Konig S, Sann H, Reichl U. 2004. Metabolism of MDCK cells during cell growth and influenza virus production in large-scale microcarrier culture. Vaccine 22(17-18):2202-2208.

[15] Genzel Y, Fischer M, Reichl U. 2006. Serum-free influenza virus production avoiding washing steps and medium exchange in large-scale microcarrier culture. Vaccine 24(16):3261-3272.

[16] Robertson JS, Cook P, Attwell AM, Williams SP. 1995. Replicative advantage in tissue-culture of egg adapted influenza-virus over tissue-culture derived virus - Implications for vaccine manufacture. Vaccine 13(16):1583-1588.

[17] Kistner O, Barrett PN, Mundt W, Reiter M, Schober-Bendixen S, Dorner F. 1998. Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. Vaccine 16(9-10):960-968.

[18] Pau MG, Ophorst C, Koldijk MH, Schouten G, Mehtali M, Uytdehaag F. 2001. The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. Vaccine 19(17-19):2716-2721.

[19] Genzel Y, Konig S, Reichl U. 2004. Amino acid analysis in mammalian cell culture media containing serum and high glucose concentrations by anion exchange chromatography and integrated pulsed amperometric detection. Analytical Biochemistry 335(1):119-125.

[20] Genzel Y, Olmer RM, Schäfer B, Reichl U. 2006. Wave microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and serum-free media. Vaccine 24(35-36):6074-6087.

[21] Genzel Y, Ritter JB, Konig S, Alt R, Reichl U. 2005. Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells. Biotechnology Progress 21(1):58-69.

[22] Sidorenko Y, Wahl A, Dauner M, Genzel Y, Reichl U. 2008. Comparison of metabolic flux distributions for MDCK cell growth in glutamine- and pyruvate-containing media. Biotechnology Progress 24(2):311-20.

[23] Wahl A, Sidorenko Y, Dauner M, Genzel Y, Reichl U. 2008. Metabolic flux model for an anchorage-dependent MDCK cell line: characteristic growth phases and minimum substrate consumption flux distribution. Biotechnology and Bioengineering 101(1):135-52.

[24] Bardeletti G. 1977. Respiration and ATP level in BHK21-13S cells during earliest stages of Rubella-virus replication. Intervirology 8(2):100-109.

[25] Burgener A, Coombs K, Butler M. 2006. Intracellular ATP and total adenylate concentrations are critical predictors of reovirus productivity from Vero cells. Biotechnology and Bioengineering 94(4):667-679.

[26] El-Bacha T, Menezes MMT, Silva MCAE, Sola-Penna M, Da Poian AT. 2004. Mayaro virus infection alters glucose metabolism in cultured cells through activation of the enzyme 6-phosphofructo 1-kinase. Molecular and Cellular Biochemistry 266(1-2):191-198.

[27] Olejnik AM, Czaczyk K, Marecik R, Grajek W, Jankowski T. 2004. Monitoring the progress of infection and recombinant protein production in insect cell cultures using intracellular ATP measurement. Applied Microbiology and Biotechnology 65(1):18--24.

[28] Zamaraeva MV, Sabirov RZ, Maeno E, Ando-Akatsuka Y, Bessonova SV, Okada Y. 2005. Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. Cell Death and Differentiation 12(11):1390-1397.

[29] Munger J, Bajad SU, Coller HA, Shenk T, Rabinowitz JD. 2006. Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus infection. PLoS Pathogens 2(12):e132.

[30] Munger J, Bennett BD, Parikh A, Feng XJ, McArdle J, Rabitz HA, Shenk T, Rabinowitz JD. 2008. Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy. Nature Biotechnology 26(10):1179-86.

[31] Bhattacharya M, Fuhrman L, Ingram A, Nickerson KW, Conway T. 1995. Single-run separation and detection of multiple metabolic intermediates by anion-exchange high-performance liquid-chromatography and application to cell pool extracts prepared from *Escherichia coli*. Analytical Biochemistry 232(1):98-106.

[32] Vogt AM, Ackermann C, Noe T, Jensen D, Kubler W. 1998. Simultaneous detection of high energy phosphates and metabolites of glycolysis and the Krebs cycle by HPLC. Biochemical and Biophysical Research Communications 248(3):527-532.

[33] Lu SB, Sun XM, Shi CO, Zhang YX. 2003. Determination of tricarboxylic acid cycle acids and other related substances in cultured mammalian cells by gradient ion-exchange chromatography with suppressed conductivity detection. Journal of Chromatography A 1012(2):161-168.

[34] Groussac E, Ortiz M, Francois J. 2000. Improved protocols for quantitative determination of metabolites from biological samples using high performance ionic-exchange chromatography with conductimetric and pulsed amperometric detection. Enzyme and Microbial Technology 26(9-10):715-723.

[35] Taha TSM, Deits TL. 1994. Detection of metabolites of Entner-Doudoroff pathway by HPLC with pulsed amperometry - Application to assays for pathway enzymes. Analytical Biochemistry 219(1):115-120.

[36] Zaldivar J, Borges A, Johansson B, Smits HP, Villas-Boas SG, Nielsen J, Olsson L. 2002. Fermentation performance and intracellular metabolite patterns in laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology 59(4-5):436--442.

[37] Hanko VP, Rohrer JS. 2000. Determination of carbohydrates, sugar alcohols, and glycols in cell cultures and fermentation broths using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Analytical Biochemistry 283(2):192-199.

[38] Stroop CJM, Bush CA, Marple RL, LaCourse WR. 2002. Carbohydrate analysis of bacterial polysaccharides by high-pH anion-exchange chromatography and online polarimetric determination of absolute configuration. Analytical Biochemistry 303(2):176-185.

[39] Glacken MW. 1988. Catabolic Control of Mammalian-Cell Culture. Bio-Technology 6(9):1041-1050.

[40] Häggström L. 2000. Cell Metabolism, Animal. In: Spier RE, editor. Encylopedia of cell technology. New York: Wiley. p 392-411.

[41] Schneider M, Marison IW, vonStockar U. 1996. The importance of ammonia in mammalian cell culture. Journal of Biotechnology 46:161-185.

[42] McKeehan WL. 1982. Glycolysis, glutaminolysis and cell-proliferation. Cell Biology International Reports 6(7):635-650.

[43] Morgan MJ, Faik P. 1981. Carbohydrate-metabolism in cultured animal-cells - Review. Bioscience Reports 1:669-686.

[44] Newland M, Greenfield PF, Reid S. 1990. Hybridoma Growth Limitations - the Roles of Energy-Metabolism and Ammonia Production. Cytotechnology 3(3):215-229.

[45] Morgan MJ, editor. 1986. Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells. New York: Plenum Press. 514 p.

[46] Medina MA, Decastro IN. 1990. Glutaminolysis and Glycolysis Interactions in Proliferant Cells. International Journal of Biochemistry 22(7):681-683.

[47] Wagner R. 1997. Metabolic Control of Animal Cell Culture Processes. In: Hauser H, editor. Mammalian cell biotechnology in protein production. Berlin [u.a.]: de Gruyter. p 193-225.

[48] Glacken MW, Fleischaker RJ, A.J S. 1986. Reduction of waste product excretion via nutrient control - Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian-cells. Biotechnology and Bioengineering 28:1376-1389.

[49] Kurano N, Leist C, Messi F, Kurano S, Fiechter A. 1990. Growth-Behavior of Chinese Hamster Ovary Cells in a Compact Loop Bioreactor .2. Effects of Medium Components and Waste Products. Journal of Biotechnology 15(1-2):113-128.

[50] Ozturk SS, Riley MR, Palsson BO. 1992. Effects of Ammonia and Lactate on Hybridoma Growth, Metabolism, and Antibody-Production. Biotechnology and Bioengineering 39(4):418-431.

[51] Hassell T, Gleave S, Butler M. 1991. Growth-Inhibition in Animal-Cell Culture - the Effect of Lactate and Ammonia. Applied Biochemistry and Biotechnology 30(1):29-41.

[52] Chen KQ, Liu Q, Xie LZ, Sharp PA, Wang DIC. 2001. Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. Biotechnology and Bioengineering 72(1):55-61.

[53] Omasa T, Higashiyama K, Shioya S, Suga K. 1992. Effects of Lactate Concentration on Hybridoma Culture in Lactate-Controlled Fed-Batch Operation. Biotechnology and Bioengineering 39(5):556-564.

[54] Andersen DC, Goochee CF. 1995. The Effect of Ammonia on the O-Linked Glycosylation of Granulocyte-Colony-Stimulating Factor Produced by Chinese-Hamster Ovary Cells. Biotechnology and Bioengineering 47(1):96-105.

[55] Baggetto LG. 1992. Deviant Energetic Metabolism of Glycolytic Cancer-Cells. Biochimie 74(11):959-974.

[56] Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Saavedra E. 2007. Energy metabolism in tumor cells. Febs Journal 274(6):1393-1418.

[57] Petch D, Butler M. 1994. Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilization. Journal of Cellular Physiology 161(1):71-76.

[58] Fitzpatrick L, Jenkins HA, Butler M. 1993. Glucose and Glutamine-Metabolism of a Murine B-Lymphocyte Hybridoma Grown in Batch Culture. Applied Biochemistry and Biotechnology 43(2):93-116.

[59] Neermann J, Wagner R. 1996. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. Journal of Cellular Physiology 166(1):152-169.

[60] Joost HG, Thorens B. 2001. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. Molecular Membrane Biology 18(4):247-256.

[61] Wood IS, Trayhurn P. 2003. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. British Journal of Nutrition 89(1):3-9.

[62] Wlaschin KF, Hu WS. 2007. Engineering cell metabolism for high-density cell culture via manipulation of sugar transport. Journal of Biotechnology 131(2):168-176.

[63] Liebl B, Muckter H, Doklea E, Fichtl B, Forth W. 1995. Reversal of Oxophenylarsine-Induced Inhibition of Glucose-Uptake in Mdck Cells. Fundamental and Applied Toxicology 27(1):1-8.

[64] Liebl B, Mückter H, Doklea E, Fichtl B, Forth W. 1995. Influence of 2,3-dimercaptopropanol and other sulfur compounds on oxophenylarsine-mediated inhibition of glucose uptake in MDCK cells. Analyst 120(3):771-774.

[65] Gstraunthaler G, Pfaller W, Kotanko P. 1985. Biochemical-characterization of renal epithelial-cell culture (LLC-PK1 and MDCK). American Journal of Physiology 248(4):F536-F544.

[66] Newsholme P, Curi R, Gordon S, Newsholme EA. 1986. Metabolism of Glucose, Glutamine, Long-Chain Fatty-Acids and Ketone-Bodies by Murine Macrophages. Biochemical Journal 239(1):121-125.

[67] Morgan MJ, Faik P. 1986. The Utilization of Carbohydrates by Animal Cells. In: Morgan MJ, editor. Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells. New York: Plenum Press. p 29-75.

[68] Ardawi MSM, Newsholme EA. 1982. Maximum Activities of Some Enzymes of Glycolysis, the Tricarboxylic-Acid Cycle and Ketone-Body and Glutamine Utilization Pathways in Lymphocytes of the Rat. Biochemical Journal 208(3):743-748.

[69] Mancuso A, Sharfstein ST, Tucker SN, Clark DS, Blanch HW. 1994. Examination of primary metabolic pathways in a murine hybridoma with carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biotechnology and Bioengineering 44:563-585.

[70] Sharfstein ST, Tucker SN, Mancuso A, Blanch HW, Clark DS. 1994. Quantitative *in vivo* nuclear magnetic resonance studies of hybridoma metabolism. Biotechnology and Bioengineering 43:1059-1074.

[71] Bonarius HPJ, Ozemre A, Timmerarends B, Skrabal P, Tramper J, Schmid G, Heinzle E. 2001. Metabolic-flux analysis of continuously cultured hybridoma cells using (CO_2)-C-13 mass spectrometry in combination with C-13-lactate nuclear magnetic resonance spectroscopy and metabolite balancing. Biotechnology and Bioengineering 74(6):528-538.

[72] Vriezen N, van Dijken JP. 1998. Fluxes and enzyme activities in central metabolism of myeloma cells grown in chemostat culture. Biotechnology and Bioengineering 59(1):28-39.

[73] Donnelly M, Scheffler IE. 1976. Energy-metabolism in respiration-deficient and wild-type chinese-hamster fibroblasts in culture. Journal of Cellular Physiology 89:39-51.

[74] Gstraunthaler G, Seppi T, Pfaller W. 1999. Impact of culture conditions, culture media volumes, and glucose content on metabolic properties of renal epithelial cell cultures - Are renal cells in tissue culture hypoxic? Cellular Physiology and Biochemistry 9(3):150-172.

[75] McKeehan WL. 1986. Glutaminolysis in Animal Cells. In: Morgan MJ, editor. Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells. New York: Plenum Press. p 111-150.

[76] Street JC, Delort AM, Braddock PSH, Brindle KM. 1993. A H-1 N-15 NMR-Study of Nitrogen-Metabolism in Cultured-Mammalian-Cells. Biochemical Journal 291:485-492.

[77] McDermott RH, Butler M. 1993. Uptake of glutamate, not glutamine synthetase, regulates adaptation of mammalian cells to glutamine-free medium. Journal of Cell Science 104 (Pt 1):51-58.

[78] Imamura T, Crespi CL, Thilly WG, Brunengraber H. 1982. Fructose as a Carbohydrate Source Yields Stable Ph and Redox Parameters in Microcarrier Cell-Culture. Analytical Biochemistry 124(2):353-358.

[79] Butler M, Imamura T, Thomas J, Thilly WG. 1983. High Yields from Microcarrier Cultures by Medium Perfusion. Journal of Cell Science 61:351-363.

[80] Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D. 1980. The Pentose Cycle - Control and Essential Function in Hela-Cell Nucleic-Acid Synthesis. Journal of Biological Chemistry 255(12):5616-5626.

[81] Zielke HR, Sumbilla CM, Sevdalian DA, Hawkins RL, Ozand PT. 1980. Lactate: a major product of glutamine metabolism by human diploid fibroblasts. Journal of Cellular Physiology 104(3):433-441.

[82] Miller WM, Wilke CR, Blanch HW. 1989. The transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: II. Glutamine pulse and step changes. Biotechnology and Bioengineering 33(4):487-499.

[83] Miller WM, Wilke CR, Blanch HW. 1989. Transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: I. Glucose pulse and step changes. Biotechnology and Bioengineering 33(4):477-486.

[84] Ljunggren J, Häggström L. 1994. Catabolic Control of Hybridoma Cells by Glucose and Glutamine Limited Fed-Batch Cultures. Biotechnology and Bioengineering 44(7):808-818.

[85] Martinelle K, Doverskog M, Jacobsson U, Chapman BE, Kuchel PW, Haggstrom L. 1998. Elevated glutamate dehydrogenase flux in glucose-deprived hybridoma and myeloma cells: evidence from 1H/15N NMR. Biotechnology and Bioengineering 60(4):508-517.

[86] Reitzer LJ, Wice BM, D K. 1979. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. Journal of Biological Chemistry 254:2669-2676.

[87] Zielke HR, Ozand PT, Tildon JT, Sevdalian DA, Cornblath M. 1978. Reciprocal regulation of glucose and glutamine utilization by cultured human diploid fibroblasts. Journal of Cellular Physiology 95(1):41-48.

[88] Ibsen KH. 1961. Crabtree Effect - a Review. Cancer Research 21(7):829-841.

[89] Sussman I, Erecinska M, Wilson DF. 1980. Regulation of cellular-energy metabolism - The Crabtree Effect. Biochimica Et Biophysica Acta 591(2):209-223.

[90] Wu R, Racker E. 1959. Regulatory Mechanisms in Carbohydrate Metabolism .4. Pasteur Effect and Crabtree Effect in Ascites Tumor Cells. Journal of Biological Chemistry 234(5):1036-1041.

[91] Barnett JA, Entian KD. 2005. A history of research on yeasts - 9: regulation of sugar metabolism. Yeast 22(11):835-894.

[92] Chapman AG, Fall L, Atkinson DE. 1971. Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. Journal of Bacteriology 108(3):1072-1086.

[93] Atkinson DE. 1968. Energy Charge of Adenylate Pool as a Regulatory Parameter. Interaction with Feedback Modifiers. Biochemistry 7(11):4030-4034.

[94] Atkinson DE. 1969. Regulation of Enzyme Function. Annual Review of Microbiology 23:47-68.

[95] Valley U, Nimtz M, Conradt HS, Wagner R. 1999. Incorporation of ammonium into intracellular UDP-activated N-acetylhexosamines and into carbohydrate structures in glycoproteins. Biotechnology and Bioengineering 64(4):401-417.

[96] Ryll T, Valley U, Wagner R. 1994. Biochemistry of Growth-Inhibition by Ammonium-Ions in Mammalian-Cells. Biotechnology and Bioengineering 44(2):184-193.

[97] Konstantinov KB. 1996. Monitoring and control of the physiological state of cell cultures. Biotechnology and Bioengineering 52(2):271-289.

[98] Voisard D, Meuwly F, Ruffieux PA, Baer G, Kadouri A. 2003. Potential of cell retention techniques for large-scale high-density perfusion culture of suspended mammalian cells. Biotechnology and Bioengineering 82(7):751-765.

[99] Xie LZ, Wang DIC. 1997. Integrated approaches to the design of media and feeding strategies for fed-batch cultures of animal cells. Trends in Biotechnology 15(3):109-113.

[100] Nadeau I, Sabatie J, Koehl M, Perrier M, Kamen A. 2000. Human 293 cell metabolism in low glutamine-supplied culture: interpretation of metabolic changes through metabolic flux analysis. Metabolic Engineering 2(4):277-292.

[101] Cruz HJ, Ferreira AS, Freitas CM, Moreira JL, Carrondo MJT. 1999. Metabolic responses to different glucose and glutamine levels in baby hamster kidney cell culture. Applied Microbiology and Biotechnology 51:579-585.

[102] Maranga L, Goochee CF. 2006. Metabolism of PER.C6 cells cultivated under fed-batch conditions at low glucose and glutamine levels. Biotechnology and Bioengineering 94(1):139-150.

[103] Europa AF, Gambhir A, Fu PC, Hu WS. 2000. Multiple steady states with distinct cellular metabolism in continuous culture of mammalian cells. Biotechnology and Bioengineering 67(1):25-34.

[104] Gambhir A, Korke R, Lee JC, Fu PC, Europa A, Hu WS. 2003. Analysis of cellular metabolism of hybridoma cells at distinct physiological states. Journal of Bioscience and Bioengineering 95(4):317-327.

[105] Korke R, Gatti MD, Lau ALY, Lim JWE, Seow TK, Chung MCM, Hu WS. 2004. Large scale gene expression profiling of metabolic shift of mammalian cells in culture. Journal of Biotechnology 107(1):1-17.

[106] Altamirano C, Paredes C, Cairó JJ, Gòdia F. 2000. Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. Biotechnology Progress 16(1):69-75.

[107] Hassell T, Butler M. 1990. Adaptation to Nonammoniagenic Medium and Selective Substrate Feeding Lead to Enhanced Yields in Animal-Cell Cultures. Journal of Cell Science 96:501-508.

[108] Bell SL, Bebbington C, Scott MF, Wardell JN, Spier RE, Bushell ME, Sanders PG. 1995. Genetic engineering of hybridoma glutamine metabolism. Enzyme and Microbial Technology 17(2):98-106.

[109] Birch JR, Boraston RC, Metcalfe H, Brown ME, Bebbington CR, Field RP. 1994. Selecting and designing cell lines for improved physiological characteristics. Cytotechnology 15(1-3):11-16.

[110] Elias CB, Carpentier E, Durocher Y, Bisson L, Wagner R, Kamen A. 2003. Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and *Trichoplusia ni* insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. Biotechnology Progress 19(1):90-97.

[111] Irani N, Wirth M, van den Heuvel J, Wagner R. 1999. Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. Biotechnology and Bioengineering 66(4):238-246.

[112] Fell DA. 1992. Metabolic control analysis: a survey of its theoretical and experimental development. Biochemical Journal 286 (Pt 2):313-330.

[113] Hofmeyr JH. 1995. Metabolic regulation: a control analytic perspective. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 27(5):479-490.

[114] Carvalhal AV, Santos SS, Calado J, Haury M, Carrondo MJT. 2003. Cell growth arrest by nucleotides, nucleosides and bases as a tool for improved production of recombinant proteins. Biotechnology Progress 19(1):69-83.

[115] Kochanowski N, Blanchard F, Cacan R, Chirat F, Guedon E, Marc A, Goergen JL. 2008. Influence of intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents on recombinant interferon-gamma glycosylation during batch and fed-batch cultures of CHO cells. Biotechnology and Bioengineering 100(4):721-733.

[116] Barnabe N, Butler M. 1994. Effect of Temperature on Nucleotide Pools and Monoclonal-Antibody Production in a Mouse Hybridoma. Biotechnology and Bioengineering 44(10):1235-1245.

[117] Grammatikos SI, Tobien K, Noe G, Werner RG. 1999. Monitoring of intracellular ribonucleotide pools is a powerful tool in the development and characterization of mammalian cell culture processes. Biotechnology and Bioengineering 64(3):357-367.

[118] Wiechert W. 2001. ^{13}C metabolic flux analysis. Metabolic Engineering 3(3):195-206.

[119] Zupke C, Sinskey AJ, Stephanopoulos G. 1995. Intracellular flux analysis applied to the effect of dissolved oxygen on hybridomas. Applied Microbiology and Biotechnology 44(1-2):27-36.

[120] Hofmann U, Maier K, Nicbel A, Vacun G, Reuss M, Mauch K. 2008. Identification of metabolic fluxes in hepatic cells from transient C-13-labeling experiments: Part I. Experimental observations. Biotechnology and Bioengineering 100(2):344-354.

[121] Kell DB. 2004. Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. Current Opinion in Microbiology 7(3):296-307.

[122] Fiehn O. 2002. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. Plant Molecular Biology 48(1-2):155-171.

[123] Khoo SH, Al-Rubeai M. 2007. Metabolomics as a complementary tool in cell culture. Biotechnology and Applied Biochemistry 47(Pt 2):71-84.

[124] Oldiges M, Lutz S, Pflug S, Schroer K, Stein N, Wiendahl C. 2007. Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools. Applied Microbiology and Biotechnology 76(3):495-511.

[125] Mashego MR, Rumbold K, De Mey M, Vandamme E, Soetaert W, Heijnen JJ. 2007. Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. Biotechnology Letters 29(1):1-16.

[126] Nielsen J, Oliver S. 2005. The next wave in metabolome analysis. Trends in Biotechnology 23(11):544-546.

[127] Weckwerth W, Fiehn O. 2002. Can we discover novel pathways using metabolomic analysis? Current Opinion in Biotechnology 13:156-160.

[128] Steuer R, Kurths J, Fiehn O, Weckwerth W. 2003. Interpreting correlations in metabolomic networks. Biochemical Society Transactions 31:1476-1478.

[129] Steuer R, Kurths J, Fiehn O, Weckwerth W. 2003. Observing and interpreting correlations in metabolomic networks. Bioinformatics 19(8):1019-1026.

[130] Kose F, Weckwerth W, Linke T, Fiehn O. 2001. Visualizing plant metabolomic correlation networks using clique-metabolite matrices. Bioinformatics 17(12):1198-1208.

[131] Roessner U, Luedemann A, Brust D, Fiehn O, Linke T, Willmitzer L, Fernie AR. 2001. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. The Plant Cell 13(1):11-29.

[132] Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, Willmitzer L. 2004. Innovation - Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. Nature Reviews Molecular Cell Biology 5:1-7.

[133] Farre EM, Tiessen A, Roessner U, Geigenberger P, Trethewey RN, Willmitzer L. 2001. Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides, sugars, organic acids, amino acids, and sugar alcohols in potato tubers using a nonaqueous fractionation method. Plant Physiology 127(2):685-700.

[134] Wittmann C, Kromer JO, Kiefer P, Binz T, Heinzle E. 2004. Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. Analytical Biochemistry 327(1):135-139.

[135] Maharjan RP, Ferenci T. 2003. Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*. Analytical Biochemistry 313(1):145-154.

[136] Buchholz A, Hurlebaus J, Wandrey C, Takors R. 2002. Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. Biomolecular Engineering 19(1):5-15.

[137] Bolten CJ, Kiefer P, Letisse F, Portais JC, Wittmann C. 2007. Sampling for metabolome analysis of microorganisms. Analytical Chemistry 79(10):3843-3849.

[138] Villas-Boas SG, Hojer-Pedersen J, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. 2005. Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. Yeast 22(14):1155-1169.

[139] Wittmann C, Hans M, van Winden WA, Ras C, Heijnen JJ. 2005. Dynamics of intracellular metabolites of glycolysis and TCA cycle during cell-cycle-related oscillation in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering 89(7):839-847.

[140] Kresnowati MTAP, van Winden WA, Almering MJH, ten Pierick A, Ras C, Knijnenburg TA, Daran-Lapujade P, Pronk JT, Heijnen JJ, Daran JM. 2006. When transcriptome meets metabolome: fast cellular responses of yeast to sudden relief of glucose limitation. Molecular Systems Biology Article Nr. 49:1-16.

[141] van der Werf MJ, Overkamp KM, Muilwijk B, Coulier L, Hankemeier T. 2007. Microbial metabolomics: toward a platform with full metabolome coverage. Analytical Biochemistry 370(1):17-25.

[142] Dunn WB. 2008. Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. Physical Biology 5(1):11001.

[143] Ramautar R, Demirci A, de Jong GJ. 2006. Capillary electrophoresis in metabolomics. Trends in Analytical Chemistry 25(5):455-466.

[144] Dunn WB, Bailey NJC, Johnson HE. 2005. Measuring the metabolome: current analytical technologies. Analyst 130(5):606-625.

[145] Villas-Boas SG, Mas S, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. 2005. Mass spectrometry in metabolome analysis. Mass Spectrometry Reviews 24(5):613-646.

[146] Wilson ID, Plumb R, Granger J, Major H, Williams R, Lenz EM. 2005. HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 817(1):67-76.

[147] LaCourse WR. 2002. Column liquid chromatography: Equipment and instrumentation. Analytical Chemistry 74:2813-2832.

[148] Dorsey JG, Cooper WT, Siles BA, Foley JP, Barth HG. 1998. Liquid chromatography: Theory and methodology. Analytical Chemistry 70:591R-644R.

[149] Eppert GJ. 1997. Flüssigchromatographie. Braunscheig/Wiesbaden: Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft. 323 p.

[150] Meyer VR. 1999. Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Frankfurt am Main: Otto Salle Verlag. 293 p.

[151] Unger KK, Weber E. 1995. Handbuch der HPLC - Teil 1 - Leitfaden für Anfänger und Praktiker. Darmstadt: GIT VERLAG. 466 p.

[152] Fritz JS, Gjerde DT. 2000. Ion Chromatography. Weinheim: Wiley-VCH. 254 p.

[153] Rocklin RD, Pohl CA, Schibler JA. 1987. Gradient elution ion chromatography. Journal of Chromatography 411:107-119.

[154] Lee YC. 1996. Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography. Journal of Chromatography A 720:137-149.

[155] Pohl CA, Stillian JR, Jackson PE. 1997. Factors controlling ion-exchange selectivity in suppressed ion chromatography. Journal of Chromatography A 789:29-41.

[156] Haddad PR, Nesterenko PN, Buchberger W. 2008. Recent developments and emerging directions in ion chromatography. Journal of Chromatography A 1184(1-2):456-473.

[157] Small H, Stevens TS, Bauman WC. 1975. Novel ion-exchange chromatographic method using conductimetric detection. Analytical Chemistry 47(11):1801-1809.

[158] Cataldi TRI, Angelotti M, D'Erchia L, Altieri G, Renzo GCD. 2003. Ion-exchange chromatographic analysis of soluble cations, anions and sugars in milk whey. European Food Research and Technology 216(1):75-82.

[159] Hajos P, Nagy L. 1998. Retention behaviours and separation of carboxylic acids by ion-exchange chromatography. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 717:27-38.

[160] Koswig S, Hofsommer H-J, Weiß J, Jensen D. 1997. Spurenanalytische Bestimmung von Ionen. Kettrup A, editor. Landsberg: Ecomed. 9 p.

[161] Qiu JS, Jin XH. 2002. Development and optimization of organic acid analysis in tobacco with ion chromatography and suppressed conductivity detection. Journal of Chromatography A 950(1-2):81-88.

[162] Liu Y, Srinivasan K, Pohl C, Avdalovic N. 2004. Recent developments in electrolytic devices for ion chromatography. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 60(3):205-232.

[163] Polta JA, Johnson DC. 1983. The Direct Electrochemical Detection of Amino-Acids at a Platinum-Electrode in an Alkaline Chromatographic Effluent. Journal of Liquid Chromatography 6(10):1727-1743.

[164] Austin-Harrison DS, Johnson DC. 1989. Pulsed Amperometric Detection Based on Direct and Indirect Anodic Reactions - a Review. Electroanalysis 1(3):189-197.

[165] Ozkan SA. 2007. LC with electrochemical detection. recent application to pharmaceuticals and biological fluids. Chromatographia 66:S3-S13.

[166] Jandik P, Cheng J, Avdalovic N. 2004. Analysis of amino acid-carbohydrate mixtures by anion exchange chromatography and integrated pulsed amperometric detection. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 60(3):191-203.

[167] Clarke AP, Jandik P, Rocklin RD, Liu Y, Avdalovic N. 1999. An integrated amperometry waveform for the direct, sensitive detection of amino acids and amino sugars following anion-exchange chromatography. Analytical Chemistry 71(14):2774-2781.

[168] Strong DL, Dasgupta PK. 1989. Electrodialytic Membrane Suppressor for Ion Chromatography. Analytical Chemistry 61(9):939-945.

[169] Strong DL, Dasgupta PK, Friedman K, Stillian JR. 1991. Electrodialytic eluent production and gradient generation in ion chromatography. Analytical Chemistry 63(5):480-486.

[170] Krstulovic AM. 1987. Handbook of Chromatography, Nucleic Acids and Related Compounds. Zweig G, Sherma J, editors. Boca Raton, FL: CRC Press. 190 p.

[171] Cordell RL, Hill SJ, Ortori CA, Barrett DA. 2008. Quantitative profiling of nucleotides and related phosphate-containing metabolites in cultured mammalian cells by liquid chromatography tandem electrospray mass spectrometry. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 871(1):115-124.

[172] Decosterd LA, Cottin E, Chen X, Lejeune F, Mirimanoff RO, Biollaz J, Coucke PA. 1999. Simultaneous determination of deoxyribonucleoside in the presence of ribonucleoside triphosphates in human carcinoma cells by high-performance liquid chromatography. Analytical Biochemistry 270(1):59-68.

[173] Gebelein M, Merdes G, Berger MR. 1992. Nucleotide preparation from cells and determination of nucleotides by ion-pair high-performance liquid-chromatography. Journal of Chromatography 577:146-150.

[174] Huang D, Zhang YH, Chen XG. 2003. Analysis of intracellular nucleoside triphosphate levels in normal and tumor cell lines by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 784(1):101--109.

[175] Bacallao R, Garfinkel A, Monke S, Zampighi G, Mandel LJ. 1994. ATP depletion - a novel method to study junctional properties in epithelial tissues. 1. Rearrangement of the actin cytoskeleton. Journal of Cell Science 107:3301-3313.

[176] Goulard F, Diouris M, Deslandes E, Floc'h JY. 1999. Nucleotides, nucleoside sugars and UDP-glucose-4-epimerase activity in the *iota*-carrageenophytes *Solieria chordalis* and *Calliblepharis jubata* (Rhodophyceae). European Journal of Phycology 34(1):21-25.

[177] Kochanowski N, Blanchard F, Cacan R, Chirat F, Guedon E, Marc A, Goergen JL. 2006. Intracellular nucleotide and nucleotide sugar contents of cultured CHO cells determined by a fast, sensitive, and high-resolution ion-pair RP-HPLC. Analytical Biochemistry 348(2):243-251.

[178] Ryll T, Wagner R. 1991. Improved Ion-Pair High-Performance Liquid-Chromatographic Method for the Quantification of a Wide Variety of Nucleotides and Sugar Nucleotides in Animal-Cells. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 570(1):77-88.

[179] Sawada S, Ono R, Sato T, Suzuki S, Arakawa O, Kasai M. 2003. Determination of sugar phosphates and nucleotides related to photosynthetic metabolism by high-performance anion-exchange liquid chromatography with fluorometric and ultraviolet detection. Analytical Biochemistry 314(1):63-69.

[180] Schoenherr I, Stapp T, Ryll T. 2000. A comparison of different methods to determine the end of exponential growth in CHO cell cultures for optimization of scale-up. Biotechnology Progress 16(5):815--821.

[181] Tomiya N, Ailor E, Lawrence SM, Betenbaugh MJ, Lee YC. 2001. Determination of nucleotides and sugar nucleotides involved in protein glycosylation by high-performance anion-exchange chromatography: Sugar nucleotide contents in cultured insect cells and mammalian cells. Analytical Biochemistry 293(1):129--137.

[182] Cohn WE. 1949. The separation of purin and pyrimidine bases and of nucleotides by ion exchange. Science 109:377-378.

[183] van Dam JC, Eman MR, Frank J, Lange HC, van Dedem GWK, Heijnen SJ. 2002. Analysis of glycolytic intermediates in *Saccharomyces cerevisiae* using anion exchange chromatography and electrospray ionization with tandem mass spectrometric detection. Analytica Chimica Acta 460(2):209-218.

[184] Jensen NBS, Jokumsen KV, Villadsen J. 1999. Determination of the phosphorylated sugars of the Embden-Meyerhoff-Parnas pathway in *Lactococcus lactis* using a fast sampling technique and solid phase extraction. Biotechnology and Bioengineering 63(3):356-362.

[185] Smits HP, Cohen A, Buttler T, Nielsen J, Olsson L. 1998. Cleanup and analysis of sugar phosphates in biological extracts by using solid-phase extraction and anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Analytical Biochemistry 261(1):36-42.

[186] Lu SB, Sun XM, Zhang YX. 2005. Insight into metabolism of CHO cells at low glucose concentration on the basis of the determination of intracellular metabolites. Process Biochemistry 40(5):1917-1921.

[187] Markuszewski MJ, Otsuka K, Terabe S, Matsuda K, Nishioka T. 2003. Analysis of carboxylic acid metabolites from the tricarboxylic acid cycle in *Bacillus subtilis* cell extract by capillary electrophoresis using an indirect photometric detection method. Journal of Chromatography A 1010(1):113-121.

[188] Schmid G, Keller T. 1992. Monitoring hybridoma metabolism in continuous suspension culture at the intracellular level. 1. Steady-state responses to different glutamine feed concentrations. Cytotechnology 9(1-3):217-229.

[189] Niessen WMA. 2006. Liquid chromatography - mass spectrometry. Boca Raton: CRC Taylor & Francis. 608 p.

[190] Kebarle P. 2000. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry 35(7):804-817.

[191] Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. 1990. Electrospray Ionization-Principles and Practice. Mass Spectrometry Reviews 9(1):37-70.

[192] Lu X, Zhao XJ, Bai CM, Zhao CX, Lu G, Xu GM. 2008. LC-MS-based metabonomics analysis. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 866(1-2):64-76.

[193] Wamelink MMC, Struys EA, Huck JHJ, Roos B, van der Knaap MS, Jakobs C, Verhoeven NM. 2005. Quantification of sugar phosphate intermediates of the pentose phosphate pathway by LC-MS/MS: application to two new inherited defects of metabolism. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 823(1):18-25.

[194] Monkkonen H, Moilanen P, Monkkonen J, Frith JC, Rogers MJ, Auriola S. 2000. Analysis of an adenine nucleotide-containing metabolite of clodronate using ion pair high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 738(2):395-403.

[195] Luo B, Groenke K, Takors R, Wandrey C, Oldiges M. 2007. Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1147(2):153-164.

[196] Buchholz A, Takors R, Wandrey C. 2001. Quantification of intracellular metabolites in *Escherichia coli* K12 using liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric techniques. Analytical Biochemistry 295(2):129-137.

[197] Oldiges M, Kunze M, Degenring D, Sprenger GA, Takors R. 2004. Stimulation, monitoring, and analysis of pathway dynamics by metabolic profiling in the aromatic amino acid pathway. Biotechnology Progress 20(6):1623-1633.

[198] Bajad SU, Lu W, Kimball EH, Yuan J, Peterson C, Rabinowitz JD. 2006. Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1125(1):76-88.

[199] Tolstikov VV, Fiehn O. 2002. Analysis of highly polar compounds of plant origin: Combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry. Analytical Biochemistry 301(2):298-307.

[200] Sekiguchi Y, Mitsuhashi N, Kokaji T, Miyakoda H, Mimura T. 2005. Development of a comprehensive analytical method for phosphate metabolites in plants by ion chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1085(1):131-136.

[201] Mashego MR, Wu L, Dam JCV, Ras C, Vinke JL, Winden WAV, Gulik WMV, Heijnen JJ. 2004. MIRACLE: mass isotopomer ratio analysis of U-C-13-labeled extracts. A new method for accurate quantification of changes in concentrations of intracellular metabolites. Biotechnology and Bioengineering 85(6):620-628.

[202] Lange HC, Eman M, van Zuijlen G, Visser D, van Dam JC, Frank J, de Mattos MJT, Heijnen JJ. 2001. Improved rapid sampling for in vivo kinetics of intracellular metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering 75(4):406-415.

[203] Shi GE. 2003. Application of co-eluting structural analog internal standards for expanded linear dynamic range in liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 17(3):202-206.

[204] Taylor PJ. 2005. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. Clinical Biochemistry 38(4):328-334.

[205] Tang L, Kebarle P. 1993. Dependence of Ion Intensity in Electrospray Mass-Spectrometry on the Concentration of the Analytes in the Electrosprayed Solution. Analytical Chemistry 65(24):3654-3668.

[206] Bottcher C, Roepenack-Lahaye EV, Willscher E, Scheel D, Clemens S. 2007. Evaluation of matrix effects in metabolite profiling based on capillary liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Analytical Chemistry 79(4):1507-1513.

[207] Avery MJ. 2003. Quantitative characterization of differential ion suppression on liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometric bioanalytical methods. Rapid Communications in Mass Spectrometry 17(3):197-201.

[208] Tweeddale H, Notley-McRobb L, Ferenci T. 1998. Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("Metabolome") analysis. Journal of Bacteriology 180(19):5109-5116.

[209] Castrillo JI, Hayes A, Mohammed S, Gaskell SJ, Oliver SG. 2003. An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. Phytochemistry 62(6):929-937.

[210] de Koning W, van Dam K. 1992. A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. Analytical Biochemistry 204(1):118-123.

[211] Gonzalez B, Francois J, Renaud M. 1997. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. Yeast 13(14):1347-1355.

[212] Theobald U, Mailinger W, Baltes M, Rizzi M, Reuss M. 1997. In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae* .1. Experimental observations. Biotechnology and Bioengineering 55(2):305-316.

[213] Wollenberger A, Ristau O, Schoffa G. 1960. Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebestücke. Pflugers Archiv Fur Die Gesamte Physiologie Des Menschen Und Der Tiere 270(4):399-412.

[214] Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L. 2000. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. Plant Journal 23(1):131-142.

[215] Khym JX, Bynum JW, Volkin E. 1977. The co-use of retention time and bandwidth measurements in evaluations of nucleotide pools by ion-exchange chromatography. Analytical Biochemistry 77(2):446-463.

[216] Mandel P. 1964. Free nucleotides in animal tissues. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 3:299-334.

[217] Riss TL, Zorich NL, Williams MD, Richardson A. 1980. Comparison of the efficiency of nucleotide extraction by several procedures and the analysis of nucleotides from extracts of liver and isolated hepatocytes by HPLC. Journal of Liquid Chromatography 3(1):133-158.

[218] Soboll S, Werdan K, Bozsik M, Muller M, Erdmann E, Heldt HW. 1979. Distribution of metabolites between mitochondria and cytosol of cultured fibroblastoid rat-heart cells. Febs Letters 100(1):125-128.

[219] Ryll T, Wagner R. 1992. Intracellular ribonucleotide pools as a tool for monitoring the physiological state of in vitro cultivated mammalian cells during production processes. Biotechnology and Bioengineering 40(8):934-946.

[220] Wiendahl C, Brandner JJ, Kuppers C, Luo B, Schygulla U, Noll T, Oldiges M. 2007. A microstructure heat exchanger for quenching the metabolism of mammalian cells. Chemical Engineering & Technology 30(3):322-328.

[221] Sellick CA, Hansen R, Maqsood AR, Dunn WB, Stephens GM, Goodacre R, Dickson AJ. 2009. Effective quenching processes for physiologically valid metabolite profiling of suspension cultured Mammalian cells. Analytical Chemistry 81(1):174-183.

[222] Soboll S, Scholz R, Heldt HW. 1978. Subcellular metabolite concentrations. Dependence of mitochondrial and cytosolic ATP systems on the metabolic state of perfused rat liver. European Journal of Biochemistry 87(2):377-390.

[223] Williamson DH, Lund P, Krebs HA. 1967. Redox State of Free Nicotinamide-Adenine Dinucleotide in Cytoplasm and Mitochondria of Rat Liver. Biochemical Journal 103(2):514-527.

[224] Heldt HW, M. M, Klingenberg M. 1972. Differences between ATP/ADP ratios in mitochondrial matrix and in extramitochondrial space. European Journal of Biochemistry 30(3):434-440.

[225] Reiss PD, Zuurendonk PF, Veech RL. 1984. Measurement of tissue purine, pyrimidine, and other nucleotides by radial compression high-performance liquid chromatography. Analytical Biochemistry 140(1):162-171.

[226] Shryock JC, Rubio R, Berne RM. 1986. Extraction of Adenine-Nucleotides from Cultured Endothelial-Cells. Analytical Biochemistry 159(1):73-81.

[227] Juengling E, Kammermeier H. 1980. Rapid assay of adenine-nucleotides or creatine compounds in extracts of cardiac tissue by paired-ion reverse-phase high-performance liquid-chromatography. Analytical Biochemistry 102(2):358-361.

[228] Khym JX. 1975. Analytical system for rapid separation of tissue nucleotides at low-pressure on conventional anion-exchangers. Clinical Chemistry 21(9):1245-1252.

[229] Brown EG, Newton RP, Shaw NM. 1982. Analysis of the free nucloetide pools of mammalian tissue by high-pressure liquid chromatography. Analytical Biochemistry 123(2):378-388.

[230] Brown PR, Miech RP. 1972. Comparison of cell extraction procedures for use with high pressure liquid chromatography. Analytical Chemistry 44(6):1072-1073.

[231] Wynants J, Belle HV. 1985. Single-run high-performance liquid chromatography of nucleotides, nucleosides, and major purine bases and its application to different tissue extracts. Analytical Biochemistry 144(1):258-266.

[232] Jungling E, Timmerman M, Aretz A, Ionescu I, Mertens M, Loken C, Kammermeier H, Fischer Y. 1996. Luminometric measurement of subnanomole amounts of key metabolites in extracts from isolated heart muscle cells. Analytical Biochemistry 239(1):41-46.

[233] Leese HJ, Biggers JD, Mroz EA, Lechene C. 1984. Nucleotides in a single mammalian ovum or preimplantation embryo. Analytical Biochemistry 140(2):443-448.

[234] Bergmeyer HU. 1989. Methods in Enzymatic Analysis. Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M, editors. Weinheim: VCH.

[235] Barnabe N, Butler M. 2000. The effect of glucose and glutamine on the intracellular nucleotide pool and oxygen uptake rate of a murine hybridoma. Cytotechnology 34(1-2):47-57.

[236] Grob MK, O'Brien K, Chu JJ, Chen DDY. 2003. Optimization of cellular nucleotide extraction and sample preparation for nucleotide pool analyses using capillary electrophoresis. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 788(1):103-111.

[237] Casazza JP, Veech RL. 1986. The measurement of xylulose 5-phosphate, ribulose 5-phosphate, and combined sedoheptolose 7-phosphate and ribose 5-phosphate in liver tissue. Analytical Biochemistry 159(2):243-248.

[238] Swezey RR. 1995. High-performance liquid-chromatographic system for separating sugar phosphates and other intermediary metabolites. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 669(2):171-176.

[239] Veech RL, Veloso D, Guynn R. 1972. Time-course of effects of ethanol on redox and phosphorylation states of rat-liver. Biochemical Journal 127(2):387-397.

[240] Huck JHJ, Struys EA, Verhoeven NM, Jakobs C, Van der Knaap MS. 2003. Profiling of pentose phosphate pathway intermediates in blood spots by tandem mass spectrometry: Application to transaldolase deficiency. Clinical Chemistry 49(8):1375-1380.

[241] Jensen UG, Brandt NJ, Christensen E, Skovby F, Norgaard-Pedersen B, Simonsen H. 2001. Neonatal screening for galactosemia by quantitative analysis of hexose monophosphates using tandem mass spectrometry: A retrospective study. Clinical Chemistry 47(8):1364-1372.

[242] Zuurbier CJ, Eerbeek O, Goedhart PT, Struys EA, Verhoeven NM, Jakobs C, Ince C. 2004. Inhibition of the pentose phosphate pathway decreases ischemia-reperfusion-induced creatine kinase release in the heart. Cardiovascular Research 62(1):145-153.

[243] Haas RH, Breuer J, Hammen M. 1988. High-performance liquid chromatographic measurement of selected blood citric acid cycle intermediates. Journal of Chromatography 425(1):47-57.

[244] Yang L, Kasumov T, Yu L, Jobbins KA, David F, Previs SF, Kelleher JK, Brunengraber H. 2006. Metabolomic assays of the concentration and mass isotopomer distribution of gluconeogenic and citric acid cycle intermediates. Metabolomics 2(2):85-94.

[245] Box GEP, Hunter WG, Hunter JS. 1978. Statistics for Experimenters. New York: John Wiley. 653 p.

[246] Dean A, Voss D. 1999. Design and Analysis of Experiments. New York: Springer. 740 p.

[247] Montgomery DC. 2005. Design and Analysis of Experiments. Hoboken, NJ: John Wiley. 643 p.

[248] Scheffler E. 1997. Statistische Versuchsplanung und -auswertung: Wiley-VCH, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie. 454 p.

[249] Weihs C, Jessenberger J, Grize Y-L. 1999. Statistische Methoden zur Qualitätssicherung und -optimierung in der Industrie. Weinheim: Wiley-VCH. XII, 436 p.

[250] Draper NR, Smith H. 1998. Applied regression analysis. New York: John Wiley. XVII, 706 p.

[251] Derringer G, Suich R. 1980. Simultaneous optimization of several response variables. Journal of Quality Technology 12(4):214-219.

[252] Kessler W. 2007. Multivariate Datenanalyse. Weinheim: Wiley-VCH. 325 p.

[253] Zar JH. 1999. Biostatistical analysis. London [u.a.]: Prentice-Hall International. 663 p.

[254] Martins AM, Camacho D, Shuman J, Sha W, Mendes P, Shulaev V. 2004. A systems biology study of two distinct growth phases of *Saccharomyces cerevisiae* cultures. Current Genomics 5(8):649-663.

[255] Steuer R. 2006. Review: on the analysis and interpretation of correlations in metabolomic data. Briefings in Bioinformatics 7(2):151-158.

[256] Camacho D, de la Fuente A, Mendes P. 2005. The origin of correlations in metabolomics data. Metabolomics 1(1):53-63.

[257] Weckwerth W, Morgenthal K. 2005. Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. Drug Discovery Today 10(22):1551-1558.

[258] Box GEP, Jenkins GM, Reinsel GC. 1994. Time series analysis forecasting and control. Upper Saddle River: Prentice-Hall International. 598 p.

[259] Chatfield C. 2000. Time-series forecasting. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC. 267 p.

[260] Arkin A, Ross J. 1995. Statistical Construction of Chemical-Reaction Mechanisms from Measured Time-Series. Journal of Physical Chemistry 99(3):970-979.

[261] Arkin A, Shen PD, Ross J. 1997. A test case of correlation metric construction of a reaction pathway from measurements. Science 277(5330):1275-1279.

[262] Wahl SA, Haunschild MD, Oldiges M, Wiechert W. 2006. Unravelling the regulatory structure of biochemical networks using stimulus response experiments and large-scale model selection. Systems Biology (Stevenage) 153(4):275-285.

[263] Le Belle JE, Harris NG, Williams SR, Bhakoo KK. 2002. A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution H-1-NMR spectroscopy. NMR in Biomedicine 15(1):37-44.

[264] Dierckx P. 1975. An algorithm for smoothing, differentiation and integration of experimental data using spline functions. Journal of Computational and Applied Mathematics 1(3):165-184.

[265] Wahl SA. 2007. Entwicklung von biologisch motivierten Methoden zur Vereinfachung kinetischer Modelle Dissertation. Siegen: Universität Siegen.

[266] Stanley CR, Lawie D. 2008. Thompson-Howarth error analysis: unbiased alternatives to the large-sample method for assessing non-normally distributed measurement error in geochemical samples. Geochemistry-Exploration Environment Analysis 8:173-182.

[267] Thompson M. 1988. Variation of Precision with Concentration in an Analytical System. Analyst 113(10):1579-1587.

[268] Thompson M, Howarth RJ. 1976. Duplicate Analysis in Geochemical Practice .1. Theoretical Approach and Estimation of Analytical Reproducibility. Analyst 101(1206):690-698.

[269] Gomase VS, Changbhale SS, Patil SA, Kale KV. 2008. Metabolomics. Current Drug Metabolism 9(1):89-98.

[270] Cole RB. 1997. Electrospray ionization mass spectrometry fundamentals, instrumentation, and applications. New York, N.Y.: Wiley. 577 p.

[271] Jandik P, Cheng J, Jensen D, Manz S, Avdalovic N. 2000. New technique for increasing retention of arginine on an anion-exchange column. Analytical Biochemistry 287(1):38-44.

[272] Liu Y, Kaiser E, Avdalovic N. 1999. Determination of trace-level anions in high-purity water samples by ion chromatography with an automated on-line fluent generation system. Microchemical Journal 62(1):164-173.

[273] Lu ZQ, Liu Y, Barreto V, Pohl C, Avdalovic N, Joyce R, Newton B. 2002. Determination of anions at trace levels in power plant water samples by ion chromatography with electrolytic eluent generation and suppression. Journal of Chromatography A 956(1-2):129-138.

[274] Torto N, Hofte A, van der Hoeven R, Tjaden U, Gorton L, Marko-Varga G, Bruggink C, van der Greef J. 1998. Microdialysis introduction high-performance anion-exchange chromatography ionspray mass spectrometry for monitoring of on-line desalted carbohydrate hydrolysates. Journal of Mass Spectrometry 33(4):334-341.

[275] Bruggink C, Maurer R, Herrmann H, Cavalli S, Hoefler F. 2005. Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1085(1):104-109.

[276] Tewari YB, Goldberg RN, Advani JV. 1991. Thermodynamics of the disproportionation of adenosine 5'-diphosphate to adenosine 5'-triphosphate and adenosine 5'-monophosphate II. Experimental data. Biophysical Chemistry 40(3):263-276.

[277] Letisse M, Rozieres M, Hiol A, Sergent M, Comeau L. 2006. Enrichment of EPA and DHA from sardine by supercritical fluid extraction without organic modifierI. Optimization of extraction conditions. Journal of Supercritical Fluids 38(1):27-36.

[278] Gonzalez M, Mendez J, Carnero A, Lobo MG, Afonso A. 2002. Optimizing conditions for the extraction of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus Costa*) using response surface methodology. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(24):6968-6974.

[279] Gullberg J, Jonsson P, Nordstrom A, Sjostrom M, Moritz T. 2004. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. Analytical Biochemistry 331(2):283-295.

[280] Yang MS, Gupta RC. 2003. Determination of energy charge potential in the C6 glioma and the HepG-2 cell culture. Toxicology Mechanisms and Methods 13(2):97-101.

[281] Carvalhal AV, Marcelino I, Carrondo MJT. 2003. Metabolic changes during cell growth inhibition by p27 overexpression. Applied Microbiology and Biotechnology 63(2):164-173.

[282] Gropp T, Brustovetsky N, Klingenberg M, Muller V, Fendler K, Bamberg E. 1999. Kinetics of electrogenic transport by the ADP/ATP carrier. Biophysical Journal 77(2):714-726.

[283] Purich DL, Fromm HJ. 1972. Studies on factors influencing enzyme responses to adenylate energy charge. Journal of Biological Chemistry 247(1):249-255.

[284] Pradet A, Raymond P. 1983. Adenine-Nucleotide Ratios and Adenylate Energy-Charge in Energy-Metabolism. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 34:199-224.

[285] Hardie DG. 2003. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. Endocrinology 144(12):5179-5183.

[286] Ritter JB, Genzel Y, Reichl U. 2006. High-performance anion-exchange chromatography using on-line electrolytic eluent generation for the determination of more than 25 intermediates from energy metabolism of mammalian cells in culture. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 843(2):216-226.

[287] Ramirez OT, Mutharasan R. 1990. Cell cycle- and growth phase-dependent variations in size distribution, antibody productivity, and oxygen demand in hybridoma cultures. Biotechnology and Bioengineering 36:839-848.

[288] Nielsen LK, Reid S, Greenfield PF. 1997. Cell cycle model to describe animal cell size variation and lag between cell number and biomass dynamics. Biotechnology and Bioengineering 56(4):372-379.

[289] Frame KK, Hu WS. 1990. Cell volume measurement as an estimation of mammalian cell biomass. Biotechnology and Bioengineering 36(2):191-197.

[290] Hess B, Chance B. 1961. Metabolic control mechanisms. VI. Chemical events after glucose addition to ascites tumor cells. Journal of Biological Chemistry 236:239-246.

[291] Sonderhoff SA, Kilburn DG, Piret JM. 1992. Analysis of mammalian viable cell biomass based on cellular ATP. Biotechnology and Bioengineering 39(8):859-864.

[292] Iida-Tanaka N, Namekata I, Tamura M, Kawamata Y, Kawanishi T, Tanaka H. 2008. Membrane-labeled MDCK cells and confocal microscopy for the analyses of cellular volume and morphology. Biological & Pharmaceutical Bulletin 31(4):731-734.

[293] Rothen-Rutishauser B, Kramer SD, Braun A, Gunthert M, Wunderli-Allenspach H. 1998. MDCK cell cultures as an epithelial in vitro model: Cytoskeleton and tight junctions as indicators for the definition of age-related stages by confocal microscopy. Pharmaceutical Research 15(7):964-971.

[294] Erlinger S, Saier MH. 1982. Decrease in Protein-Content and Cell-Volume of Cultured Dog Kidney Epithelial-Cells during Growth - Importance for Transport Measurements. In Vitro-Journal of the Tissue Culture Association 18(3):196-202.

[295] BRENDA. www.brenda-enzymes.org. Zugegriffen am 24.10.2008.

[296] Quesney. 2001. Characterization of Vero cell growth and death in bioreactor with serum-containing and serum-free media. Cytotechnology 35:115-125.

[297] Kurano N, Leist C, Messi F, Gandor C, Kurano S, Fiechter A. 1990. Growth-Kinetics of Chinese-Hamster Ovary Cells in a Compact Loop Bioreactor .3. Selection and Characterization of an Anchorage-Independent Subline and Medium Improvement. Journal of Biotechnology 16(3-4):245-258.

[298] Aunins JG, Henzler H-J. 1993. Aeration in Cell Culture Bioreactors. In: Stephanopoulos G, editor. Bioprocessing. 2nd ed. Weinheim u. a.: VCH. p 219-281.

[299] Stevens KM. 1965. Oxygen requirements for liver cells in vitro. Nature 206(980):199.

[300] Bock A. 2009. Dissertation. in Vorbereitung p.

[301] Lynch RM, Balaban RS. 1987. Energy-Metabolism of Renal-Cell Lines, A6 and MDCK - Regulation by Na-K-ATPase. American Journal of Physiology 252(2):C225-C231.

[302] Krämer C. 2007. Wachstum und Infektion adhärenter Zellkulturen auf 2DMicroHex^{TM}-Microcarriern zur Influenzavirusproduktion Bachelorarbeit. Köthen: Hochschule Anhalt (FH).

[303] Glaser G, Giloh H, Kasir J, Gross M, Mager J. 1980. On the Mechanism of the Glucose-Induced Atp Catabolism in Ascites Tumor-Cells and Its Reversal by Pyruvate. Biochemical Journal 192(3):793-800.

[304] Somsen OJG, Hoeben MA, Esgalhado E, Snoep JL, Visser D, van der Heijden RTJM, Heijnen JJ, Westerhoff HV. 2000. Glucose and the ATP paradox in yeast. Biochemical Journal 352:593-599.

[305] Dietzsch C. 2007. Influenza Impfstoffherstellung mit adhärenten Vero Zellen Diplomarbeit. Dresden: Technische Universität Dresden.

[306] van den Brink J, Canelas AB, van Gulik WM, Pronk JT, Heijnen JJ, de Winde JH, Daran-Lapujade P. 2008. Dynamics of glycolytic regulation during adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to fermentative metabolism. Applied and Environmental Microbiology 74(18):5710-5723.

[307] Feliu JE, Diazgil JJ, Garciacanero R, Gosalvez M. 1975. Interconvertible Forms of Class a Pyruvate-Kinase from Ehrlich Ascites Tumor-Cells. Febs Letters 50(3):334-338.

[308] Wolf J, Passarge J, Somsen OJG, Snoep JL, Heinrich R, Westerhoff HV. 2000. Transduction of intracellular and intercellular dynamics in yeast glycolytic oscillations. Biophysical Journal 78(3):1145-1153.

[309] Ibsen KH, Coe EL, Mckee RW. 1958. Interrelationships of Metabolic Pathways in the Ehrlich Ascites Carcinoma Cells .1. Glycolysis and Respiration (Crabtree Effect). Biochimica Et Biophysica Acta 30(2):384-400.

[310] Overgaard-Hansen K. 1965. Metabolic regulation of the adenine nucleotide pool. I. Studies on the transient exhaustion of the adenine nucleotides by glucose in Ehrlich ascites tumor cells. Biochimica Et Biophysica Acta 104(2):330-347.

[311] Williamson DH, Brosnan JT. 1974. Concentrations of Metabolites in Animal Tissues. In: Bergmeyer HU, editor. Methods of Enzymatic Analysis. 3rd ed. Weinheim: Verlag Chemie. p 2266-2302.

[312] Carvalhal AV, Coroadinha AS, Alves PM, Moreira JL, Hauser H, Carrondo MJT. 2002. Metabolic changes during cell growth inhibition by the IRF-1 system. Enzyme and Microbial Technology 30(1):95-109.

[313] Nash RW, McKay BS, Burke JM. 1994. The response of cultured human retinal-pigment epithelium to hypoxia - a comparison to other cell types. Investigative Ophthalmology & Visual Science 35(6):2850-2856.

[314] Grammel H, Ghosh R. 2008. Redox-state dynamics of ubiquinone-10 imply cooperative regulation of photosynthetic membrane expression in *Rhodospirillum rubrum*. Journal of Bacteriology 190(14):4912-4921.

[315] Kasischke KA, Vishwasrao HD, Fisher PJ, Zipfel WR, Webb WW. 2004. Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. Science 305(5680):99-103.

[316] Bettenbrock K, Fischer S, Kremling A, Jahreis K, Sauter T, Gilles ED. 2006. A quantitative approach to catabolite repression in *Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry 281(5):2578-2584.

Anhang

Tabelle A 1: Liste der genutzten Geräte

Autoklav	Thermo Scientific
Autoklav 5075 ELVC	Tuttnauer Systec
Autoklav CV-EL 12L	Centroclav Steriliser
Bioprofile 100 plus Analyzer	nova biomedical
CO_2-Brutschrank Hera cell 240	Hereus
Digitalcamera	Canon
Digitalkamera	Nikkon
Feinwaage	Mettler Toledo
Flaschen (0,2 l; 0,5 l; 1 l)	Schott
Kühlzentrifuge Biofuge primo R	Heraeus
Laborflaschen (0,1 – 5,0 L)	Schott
Laser-Scanning-Mikroskop 510	Carl Zeiss AG
Magnetrührer VarioMag	Biosystem
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss
Mikroskop Axiovert S 100	Zeiss
Mikroskop HAL 100	Zeiss
pH-Meter inoLab	WTW
Pipettierhilfen (10 µL, 100 µL, 200 µL, 1 mL, 5 mL)	Biohit
Pipettierhilfen (10 µL, 100 µL, 200 µL, 1 mL, 5 mL)	Eppendorf Research
Reinswasseranlage Milli-Q-Biocel A10	Millipore
Rollerflaschenschrank Incudrive	Schütt
Rollerflaschenschrank R2P	Wheaton
Sicherheitswerkbank Klasse II Herasafe	Heraeus
Sterilwerkbank Hera safe	Heaeus
Thermoblock QBT	Grant
Trockenschrank	Heraeus
Vi-Cell TM XR Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter
Vortex	Heidolph Reax
Waage PG 5002-S Delta Range	Mettler Toledo
Chromatographieanlage DX320	Dionex
Chromatographieanlage DX600	Dionex
Luminometer (L 940)	Berthold
Ultraschallbad	VWR

Tabelle A 2: Liste der genutzten Verbrauchsmaterialien

1,5 mL Küvetten	Brand
6-Well Platten	Greiner bio-one
ATPlite Luminescence ATP Detection Assay System	Perkin-Elmer
Chromatographiesäule AS11; Serien-Nr.: 003391, 003392, 003583, 003628, 003721, 003723, 003867, 003868	Dionex
Chromatographiesäule CarboPac PA-100; Serien-Nr. 001053	Dionex
Chromatographievorsäule AG11; Serien-Nr.:003523, 003523, 004164,004257	Dionex
Chromatographievorsäule CarboPac PA-100G; Serien-Nr. 001021	Dionex
Einmalspritzen (5 mL, 10 mL)	B. Braun
Eluentengeneratorkartusche EGCII Serien-Nr. 060572325019,	Dionex
Falconröhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner bio-one
Microtiterplatten (96 Well) mit U-Boden	Greiner bio-one
Microtiterplatten (96Well) mit Flachboden	Greiner bio-one
Pipettenspitzen (10 µL, 100 µL, 200 µL, 1 mL, 5 mL)	Eppendorf
Pipettenspitzen (2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL)	Greiner bio-one
Reaktionsgefäße (500 µL, 1800 µL, 2200 µL)	Greiner bio-one
Rollerflaschen	Greiner bio-one
Sterilfilter (0,22 µm)	Sartorius BBI
T-Flaschen Cellstar (T25, T75, T175)	Greiner bio-one

Tabelle A 3: Liste der genutzten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Produktnummer
2PG	Sigma-Aldrich	P-0257
3PG	Sigma-Aldrich	P-8877
Acetat	Fluka	71185
Acetoacetat	Sigma-Aldrich	A-8509
Acetonitril	Roth	4722.2
Acetyl-CoA	Fluka	1031
ADP	Sigma-Aldrich	A-2754
Ameisensäure	Merck	8.22254
AMP	Sigma-Aldrich	A-1752
Aspartat	Sigma-Aldrich	AA-S-18
ATP	Sigma-Aldrich	A-2383
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck	208291
cAMP	Sigma-Aldrich	A3262
CDP	Sigma-Aldrich	C-9755
Chloroform	Roth	7331.1
cis-Aconitat	Sigma-Aldrich	A-3412
Citrat	Sigma-Aldrich	C-1909
CMP	Sigma-Aldrich	C-1006
CTP	Sigma-Aldrich	C-1506
dATP	Sigma-Aldrich	D-6500
dCTP	Sigma-Aldrich	D-4635
dGTP	Sigma-Aldrich	D-4010
DHAP	Sigma-Aldrich	D-7137
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck	1.06586
DMEM (ohne Glutamin, ohne Glucose)	PAA Laboratories GmbH	E15-079
dTTP	Sigma-Aldrich	D-5288
E4P	Sigma-Aldrich	E-0377
EpiSerf	Gibco	10732-022
Essigsäure	Merck	8.18755
Ethanol	Roth	9065.4
F.M.V. Pepton	IOL Instruments	-
F1P	Sigma-Aldrich	F0877
F6P	Sigma-Aldrich	F-3627
FAD	Sigma-Aldrich	F-6625
FCS	PAN	3302-P280703
Formiat	Merck	1.06443
F16bP	Merck	-
Fumarat	Sigma-Aldrich	F-2752
G1P	Sigma-Aldrich	G-7000
G6P	Sigma-Aldrich	G-7772
GAP	Sigma-Aldrich	G-5152
GDP	Sigma-Aldrich	G-7127
Glucose	Merck	1.04074
Glutamat	Merck	1.00291
GMEM	Gibco	22100-093
GMP	Sigma-Aldrich	G-8377
GTP	Sigma-Aldrich	G-8877
Hydroxybutyrat	Sigma-Aldrich	16689-8
Isocitrat	Sigma-Aldrich	I-1252
Isopropanol	Roth	CP41.2
Kaliumchlorid	Merck	1.04935
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	1.04877
Lactat	Sigma-Aldrich	L-7022
Glutamin	Sigma-Aldrich	G-3126
Malat	Sigma-Aldrich	M-0875
Methanol	Roth	4627.5
NAD	Sigma-Aldrich	N-1636
NADH	Sigma-Aldrich	N-4505
NADP	Sigma-Aldrich	N-5755
NADPH	Sigma-Aldrich	N-5130
Natriumchlorid	Roth	3957.1
Natriumhydrogencarbonat	Roth	6885.1
Natriumhydroxid	Merck	1.08482
Natriumnitrat	Merck	1.05537

Natriumsulfat	Merck	1.06637
Oxalacetat	Sigma-Aldrich	O-4126
PEP	Sigma-Aldrich	P-0564
Perchlorsäure	Merck	100518
Phenolrot	Sigma-Aldrich	P-3532
PP_i	Sigma-Aldrich	221368
Pyruvat	Sigma-Aldrich	P-8574
R5P	Sigma-Aldrich	R-7750
Salzsäure	Roth	4625.1
Schwefelsäure	Merck	1.00731
Succinat	Sigma-Aldrich	S-0141
Succinyl-CoA	Fluka	85985
Trichloressigsäure	Merck	1.00807
Trypanblau	Merck	111732
Trypsin (2,5%, porcine) 0,5 mg/mL	Gibco	27250-018
TTP	Sigma-Aldrich	T-0251
UDP	Sigma-Aldrich	U-4125
UDP-Gal	Sigma-Aldrich	U-4500
UDP-GalNAc	Sigma-Aldrich	U-5252
UDP-Glc	Sigma-Aldrich	U-4625
UDP-GlcNAc	Sigma-Aldrich	U-4375
UMP	Sigma-Aldrich	U-6375
UTP	Sigma-Aldrich	U-6625
α-Ketoglutarat	Sigma-Aldrich	K-1750

Tabelle A 4: Zur Zellzählung mit dem Gerät ViCell XR genutzte Zelltypen mit den entsprechenden Geräteparametern

Parameter	**MDCK_100**	**MDCK_big**	**Vero_100**
Threshold	85	85	85
CenterThreshold	90	90	75
MinimumDiameter	8	8	8
MaximumDiameter	25	50	50
MinimumCenterSize	4	4	5
Frames	100	100	100
FocusParameter	80	80	100
SampleFlushCycles	3	3	3
TrypanBlueMixingCycles	3	3	3
MinimumCircularity	0	0	0
DeclusterDegree	8	8	8

Tabelle A 5: Zusammenfassung der verschiedenen Kultivierungsexperimente, den Versuchsbedingungen und den entsprechenden Bedingungen zur Anpassung einer glättenden Funktion in Form eines Splines (Glättungsfaktoren *S*) oder eines Boltzmann Sigmoides (sigm) für die unterschiedlichen Metaboliten.

Experiment #	GMEM-Z[c]	EpiSerf[c]	Austausch durch PBS	Medium Zugabe	n1	n3	n3	n4	n4	n5	n5	n6	n6	n6	n6	n2	n7	n7	n7	n7	n7
Zelllinie[b]	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V
Medium[c]	G	E	G	G	G	G	E	G	E	G	E	E	D	D	D	06.3.07	D	D	D	D	D
					20.2.07	06.3.07	139633	15.3.07	139633	20.7.07	14633	14633									
supplementiert mit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+Pyr	+Gln	+Glc	+Gln	+Pyr	-	+Gln	+Glc	+Gln	+Pyr
Probenahme-zeitpunkte	47	47	40	12	14	13	13	14	14	20	20	20	16	16	16	16	13	16	16	16	16
Punkte für Interpolation	192	192	178	162	224	97	97	121	121	191	191	191	115	115	115	115	234	120	120	120	120
Max. Anzahl Punkte für τ	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
tmax	198 h	198 h	120 min	60 min	262 h	104 h	104 h	127 h	127 h	198 h	198 h	198 h	121 h	121 h	121 h	121 h	241 h	128 h	128 h	128 h	128 h
Glc	100*	100*	-	-	1	sigm	sigm	1	sigm	100*	sigm	sigm	sigm	sigm	0,1*	0,1*	sigm	sigm	sigm	100*	sigm
Lac	100*	100*	-	-	1	sigm	sigm	10	sigm	100*	sigm	sigm	sigm	10*	100*	100*	5	sigm	sigm	100	100*
Gln	100*	100*	-	-	1	sigm	sigm	1	sigm	100*	sigm	10*	sigm	10*	sigm	100*	5	sigm	100*	sigm	100
Glu	100*	100*	-	-	sigm	sigm	10	sigm	10	sigm	sigm	sigm	1	10*	100	100*	5	10	100*	100	100*
NH_4^+	100*	100*	-	-	-	10	10	2	5	30*	sigm	sigm	sigm	sigm	sigm	sigm	5	100	100*	sigm	sigm
Pyr	100	1000	20	10	0,5	5	1	2	1	2	10*	10*	10	10	10	10	1*	10*	10*	10	10
Succ	100*	200*	10	10	0,5*	1	1*	1	1	1	10*	1	5	5	5	5	1	1	10*	10	10
Mal	50	50	10	0,5	0,5*	1	1*	0,5	1	1	1	1	5	5	5	5	0,5	1	1	1	1
CMP	1000	1000	100	10	10	10	10	10	10	10	1	1	10	10	10	10*	5	10	10	10	10
α-KG	100*	100*	10	1	0,5	1	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,3	10	10	10	1
F1P	10	10*	100*	0,2	0,2*	0,1*	0,1*	0,5*	0,1*	0,1	0,05	0,1*	0,1	0,1*	0,05*	0,05	5	10	1*	10*	100*
G6P	50	30*	100*	1	0,05	0,5	0,5*	0,5	0,1	0,5	0,2*	1	0,1	0,1*	1*	1	5	1	1	100	100
F6P	10	30*	100	2	0,1*	0,5	0,5*	0,1*	0,1*	0,1*	0,1	1	0,1	0,1	0,1	1	5	10	1	100	100
Fum	100	100	10	0,5	0,5*	0,5	0,5*	0,2	0,5	0,2	0,1	0,1	1	1	1	1	0,5	1	1	1	0,1
AMP	500	500	1000	5	1	5	5	5	10	2	10	10	10	10	1	1	5	10	10	10	10
R5P	100	100	100*	5	0,2	0,5	1	0,5	1	0,1	0,5	1	10	0,1	0,5	0,5*	5	10	1	10	100
3PG	200	500	100*	5	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,1	1	1	10	10*	10	10	1	10	10	10	10*
Citr	1000	1000	20	0,1	0,1*	0,5	1	0,5	1	1	1	1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5*	5	5	5	5
Isoc	1000	1000	20*	0,1	0,1	0,5	1	5	1	1	1	1	0,5	0,5	0,5*	0,5	1	1	1*	1	1
CDP	1000	1000	500	10	1	1	5	1	1	10	10	1	1	10	1	1	10	1	1	10	10*
UDP-GlcNAc	1000	5000	100	5	1	0,5	0,5	1	0,5	0,1	1	1	1	1	0,1	1	0,1	1	1	1	10
UDP-GalNAc	1000	5000	100	5	1	0,5	0,5	1	0,5	0,1	1	1	1	1	0,1	1	0,1	1*	1	1	10
PEP	1000	1000	100	0,5	0,5	1	0,5	1	0,5	10	1	1	10	10*	10	10	2*	1	10	10*	10*
cAco	1000	1000	20	0,1	0,1	1	5	1	1	1	1	1	0,1	0,5	0,1	0,5	2	1	1	1	1
UMP	1000	200	100	10	0,5*	1	0,5	5	1	1	0,1	10	0,5	0,5	0,1	0,5	0,1	1	1	1	1
UDP-Glc	1000	200	100	1	0,5	1	0,5	5	1	1	0,2	10	0,5	0,5	0,1	0,5	0,1	1	1	1	10*
ADP	500	500	200	5	1	5	1	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1	1	10*
F16bP	20	20*	10*	1	0,1*	0,2*	0,1	0,5*	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05	0,05*	0,05	0,05	0,05	1	10	100	100
GMP	1000	1000	500	5	1	2	1	5	5	2	1	10	10	10	10	10	10	1	1	10	10
CTP	100	100	500	1	0,1	1	0,5	0,5	0,5	1	0,1	1	1	1	1	2	0,1	1	1	1	1
ATP	500	500	500	5	0,5	1	1	0,5	1	1	1	1	1	1	10	10	0,1	1	1	1	1
UDP	1000	1000	500	5	1	10	1	5	1	2	1	1	1	1	10	1	1	1	1	2	1*
GDP	5000	1000	500	5	1	10	5	5	1	2	5	10	1	1	1	1	1	2*	2*	1	2*
UTP	200	200*	100	5	0,2	1	0,5	0,5	0,5	1	0,5	2	1	1	1	1	0,1	1	1	1	1
GTP	500	500	500	5	0,2	0,5	1	1	1	1	0,5	2	0,5	0,5	1	1	0,1	2*	2*	2*	2*
Energy Charge	500	500*	100*	5	1	5*	1	5	5	2	2	1	1	1	1	1	1	10	1	2	10
Pyr extraz.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-

[a] Zusammenfassung aus jeweiligen Experimenten n3, n4, n5
[b] Zelllinie: M: MDCK; V: Vero
[c] Medium: G: GMEM-Z (gruppeninternes Herstellungsdatum) ; E: EpiSerf (Chargen-Nr); D: DMEM ohne Glc und ohne Gln mit Serum (Charge: PAN 250922)
* deutet an, dass eine Anpassung der genutzten Standardabweichung (als Gewichtungsfaktor) erforderlich war, um eine sinnvolle Anpassung durchzuführen

Tabelle A 6: Validierungstabelle für die Chromatographiemethode geordnet nach Retentionsverhalten

	Peak [a]	Detektor [b]	Var. [c]	Reg. [d]	Detektionslimit	n [e]	Bereich [f]		R^2 [g]	Konz. Fig. 1
							niedrig	hoch		
					(µM)		(µM)	(µM)		(µM)
Lactat+Acetat	H	ECD	h	p	0,487	7	1,300	40,300	0,996	33,80
Pyruvat	F	ECD	nh	l	0,246	7	1,000	31,000	0,997	26,00
Cl	F	ECD	h	l	0,781	6	3,000	15,500	0,992	13,00
Nitrat	F	ECD	h	l	0,545	6	3,000	15,500	0,996	13,00
Succinat	F	ECD	h	p	0,188	6	3,000	15,500	0,999	13,00
Malat+CMP	F	ECD	h	p	0,149	6	8,250	42,625	0,999	35,75
CMP	F	UV	h	l	0,060	7	0,125	3,875	1,000	3,25
Sulfat+ α-Ketoglutarat	F	ECD	nh	l	0,827	7	4,500	139,50	0,999	117,00
α-Ketoglutarat	F	UV	h	l	0,623	6	3,000	15,500	0,995	13,00
G6P	F	ECD	h	l	0,221	6	1,050	5,425	0,996	27,30
Fumarat	F	UV	nh	l	0,133	7	0,500	15,500	1,000	13,00
F6P	F	ECD	h	p	0,018	6	1,050	5,425	0,998	4,55
AMP + R5P	F	ECD	h	p	0,185	6	6,000	31,000	0,999	26,00
AMP	F	UV	nh	l	0,014	6	0,750	19,500	0,999	19,50
Oxalacetat	F	ECD	nh	l	0,100	7	0,500	15,500	0,989	13,00
3PG	F	ECD	nh	l	0,137	7	0,375	11,625	0,999	9,75
2PG	F	ECD	nh	l	0,101	7	0,125	3,875	0,997	3,25
Citrat + CDP	H	ECD	h	p	1,334	6	9,750	50,375	0,999	42,25
CDP	F	UV	nh	l	0,046	6	0,125	3,250	0,999	3,25
UDP-GalNAc	F	UV	nh	l	0,036	7	0,250	7,750	1,000	6,50
Isocitrat+UDP-GlcNAc	F	ECD	nh	l	0,215	7	0,625	19,375	0,999	16,25
UDP-GlcNAc	F	UV	nh	l	0,072	7	0,500	15,500	1,000	13,00
PEP+cis-Aconitat	F	ECD	nh	l	0,109	7	0,250	7,750	0,999	6,50
cis-Aconitat	F	UV	h	l	0,044	7	0,125	3,875	0,999	3,25
UMP+UDP-Glc	F	UV	nh	l	0,046	7	0,375	11,625	1,000	9,75
UDP-Glc	H	UV	nh	l	0,137	7	0,250	7,750	0,999	6,50
trans-Aconitat	H	ECD	nh	l	0,108	7	0,125	3,875	0,995	3,25
ADP	F	UV	nh	l	0,132	7	1,000	31,000	1,000	26,00
GMP	H	UV	nh	l	0,019	7	0,125	3,875	0,999	3,25
F1,6bP	F	ECD	nh	l	0,143	7	0,375	11,625	0,999	9,75
CTP	H	UV	nh	l	0,038	7	0,125	3,875	0,999	3,25
UDP	H	UV	nh	l	0,055	7	0,125	3,875	0,999	3,25
ATP	F	UV	nh	l	0,249	7	1,250	38,750	1,000	32,50
GDP	H	UV	nh	l	0,045	7	0,125	3,875	0,999	3,25
UTP	F	UV	nh	l	0,043	7	0,250	7,750	1,000	6,50
GTP	F	UV	nh	l	0,026	7	0,125	3,875	1,000	3,25

20 µL Injektionsvolumen, 8 Injektionen für jede Standardkonzentration

[a] Daten berechnet aus der Peakfläche (F) oder Peakhöhe (H)

[b] Detektorsignal benutzt für die Validierung

[c] Varianz für den Bereich der Quantifizierung: homogen (h), nicht-homogen (nh)

[d] genutzte Regression, die mittels des Tests nach Mandel ermittelt wurde : linear (l), polynomisch zweiter Ordnung (p)

[e] Anzahl der äquidistanten Punkte, die für die Kalibrierung eingesetzt wurden (n)

[f] Bereich der Quantifizierung

[g] Bestimmtheitsmaß

Tabelle A 7: Optimiertes Gradientenprogramm für die Chromatographieanlage DX320 zur Analyse von Metaboliten aus Zellextrakten

Zeit (min)	KOH Konzentration (mM)	Kurve [a]
0,0	0,2	5
4,0	9,0	7
6,5	3,0	1
6,8	9,0	5
7,0	9,0	5
9,5	3,5	2
16,0	3,5	5
17,0	7,5	9
22,5	6,0	1
25,0	8,0	3
29,0	10,0	7
30,0	22,0	5
32,0	17,5	1
36,5	17,5	5
42,0	20,0	5
45,5	36,0	5
50,0	55,0	7
52,0	61,0	3
56,0	78,0	5
56,1	100	5
62,0	100	5
62,1	0,2	5
68,0	0,2	5

[a] Die Krümmungen der Kurven des Gradienten sind in der Bedienungsanleitung zur Pumpe (Dionex) definiert. Kurve 5 entspricht einer Geraden, wohingegen Werte > 5 einen konkaven Kurvenverlauf beschreiben und Werte <5 einen konvexen Verlauf.

Tabelle A 8: Liste der abschließend genutzten Kalibrierungsfunktionen

Detektor	**MS**	**UV**	**LF**
Pyruvat	Quad	x	x
Succinat	XQOff	x	x
Malat	Quad	x	x
Malat+CMP	x	x	QOff
CMP	x	x	LOff
Ketoglutarat	XQOff	x	x
Fructose-1-P	QOff	x	x
Sulfat+Ketoglutarat	x	x	QOff
Glucose-6-P	XQOff	x	XQOff
Fumarat	XQuad	XLOff	x
Fructose-6-P	QOff	QOff	XQOff
259_2	QOff	x	x
AMP	XLOff	LOff	
Ribose-5-P	XQuad	LOff	Quad
Phosphat	x	x	LOff
3PG	XQuad	x	QOff
Citrat + CDP	x	x	QOff
Citrat	XQOff	x	x
CDP	XQuad	QOff	x
UDP-NAc-Gal	XQOff	XLOff	x
UDP-NAc-Glc	QOff	XLOff	x
Isocitrat	XQuad	x	x
PEP	XQuad	x	x
cis-Aconitat	XQuad	x	x
UMP+UDP-G	x	XLOff	x
UMP	XLOff	x	x
UDP-Glc	XQOff	x	x
ADP	x	LOff	x
GMP	XQuad	XQOff	x
Fructose-1,6-bP	XQOff	x	Quad
CTP	x	LOff	x
UDP	x	LOff	x
ATP	x	LOff	x
GDP	x	LOff	x
UTP	x	Lin	x
GTP	x	LOff	x

Lin:	lineare Regressionsfunktion durch den Ursprung
LOff:	lineare Regressionsfunktion, nicht durch den Ursprung
XLOff:	lineare Regressionsfunktion, nicht durch den Ursprung, Gewichtung *(1/Konzentration)*
Quad:	quadratische Regressionsfunktion durch den Ursprung
QOff:	quadratische Regressionsfunktion, nicht durch den Ursprung
XQuad:	quadratische Regressionsfunktion durch den Ursprung; Gewichtung (*1/Konzentration*)
XQOff:	quadratische Regressionsfunktion, nicht durch den Ursprung; Gewichtung (*1/Konzentration*)

Tabelle A 9: Schätzung der Standardabweichung der chromatographischen Bestimmungsmethode für die einzelnen Analyten und die verschiedenen Detektoren basierend auf den mehrfachbestimmten Messungen der Kalibrierstandards aus 16 Messsequenzen für die einzelnen Standardverdünnungen (2,5 µL (25) - 155,0 µL (1550) auf 1000,0 µL).

Analyt	Detektion	Relative Standardabweichung [%]								Funktion zur Schätzung der Standardabweichung
		25	50	300	550	800	1050	1300	1550	
3PG	LF	9,9	8,9	2,5	2,6	2,2	2,0	1,8	1,9	y = 0,0167x + 0,0081
3PG	MS	7,1	7,3	9,5	9,2	10,8	11,2	8,1	7,4	y = 0,0821x + 0,0148
ADP	UV	1,3	1,1	1,1	1,0	1,1	0,8	0,7	0,6	y = 0,0059x + 0,0271
AMP	UV	4,6	3,0	1,8	1,5	1,6	1,3	1,7	1,8	y = 0,0163x + 0,0008
AMP	MS	8,0	7,9	9,3	8,2	7,8	8,0	6,7	8,2	y = 0,0760x + 0,0155
ATP	UV	1,5	1,4	0,8	0,7	1,1	0,6	0,6	0,5	y = 0,0054x + 0,0379
CDP	UV	11,4	6,0	2,2	2,0	1,4	1,3	1,6	1,1	y = 0,0109x + 0,0080
CDP	MS	8,0	10,9	8,4	7,4	10,0	12,2	9,8	11,1	y = 0,1111x + 0,0135
cis-Aconitat	MS	7,1	8,0	9,3	7,1	8,3	8,9	8,2	8,1	y = 0,0827x + 0,0002
Citrate	MS	13,2	9,7	12,2	9,8	11,4	11,9	12,1	10,0	y = 0,1092x + 0,0557
Citrate + CDP	LF	3,7	2,7	1,2	1,4	1,3	1,0	1,2	1,0	y = 0,0103x + 0,0403
CMP	UV	13,3	10,6	9,3	4,3	3,3	3,7	3,1	2,0	y = 0,0200x + 0,0262
CTP	UV	8,4	6,4	1,5	0,9	1,1	0,8	0,8	1,0	y = 0,0076x + 0,0079
Fructose-1,6-bP	LF	3,0	2,1	1,2	1,2	1,6	0,7	0,7	0,7	y = 0,0065x + 0,0436
Fructose-1,6-bP	MS	4,1	6,2	8,6	7,7	7,4	6,7	6,9	9,2	y = 0,0786x
Fructose-6-P	MS	6,1	7,6	9,0	7,6	7,8	8,7	6,4	7,7	y = 0,0738x + 0,0068
Fumarat	UV	12,0	10,2	2,7	1,8	1,7	1,1	1,2	1,1	y = 0,0083x + 0,0235
Fumarat	MS	9,1	8,6	8,4	11,1	9,7	9,7	6,4	5,4	y = 0,0615x + 0,0588
GDP	UV	5,2	3,4	2,0	2,6	1,6	1,9	2,1	1,7	y = 0,0175x + 0,0054
Glucose-6-P	LF	7,0	7,5	2,8	2,0	2,6	1,9	2,2	2,2	y = 0,0204x + 0,0061
Glucose-6-P	MS	9,8	10,8	7,2	7,6	6,6	7,7	5,9	6,4	y = 0,0626x + 0,0127
GMP	UV	8,8	8,0	1,6	1,4	1,2	0,6	1,1	0,7	y = 0,0061x + 0,0081
GMP	MS	14,1	8,0	9,3	6,7	9,0	9,6	7,5	8,2	y = 0,0820x + 0,0031
GTP	UV	5,8	3,6	0,9	0,6	1,0	0,8	0,7	0,5	y = 0,0049x + 0,0136
Isocitrat	MS	10,4	12,6	9,0	7,4	8,1	11,9	14,0	3,4	y = 0,0055x + 0,0177
α-Ketoglutarat	MS	7,2	7,7	7,9	8,3	10,3	12,3	8,4	7,1	y = 0,0838x + 0,0433
Malat	MS	7,8	10,8	10,0	9,6	10,8	13,3	14,0	11,0	y = 0,1214x
Malat+CMP	LF	8,8	5,9	2,5	2,7	1,8	1,9	2,2	1,1	y = 0,0137x + 0,0760
PEP	MS	7,5	9,2	13,5	10,0	10,5	10,2	8,1	9,6	y = 0,0905x + 0,0122
PEP+*cis*-Aconitat	LF	8,9	5,8	2,6	2,0	2,0	1,4	1,4	1,2	y = 0,0110x + 0,0179
Pyruvat	MS	8,4	5,9	9,5	8,1	6,8	11,8	9,2	7,8	y = 0,0880x + 0,0036
Ribose-5-P	MS	14,7	11,3	11,2	9,5	9,4	8,8	5,3	8,3	y = 0,0707x + 0,0192
Succinat	MS	15,4	15,3	9,3	8,6	11,5	15,0	8,0	8,1	y = 0,0903x + 0,1422
UDP	UV	10,3	2,6	0,9	0,9	1,3	0,7	0,6	0,9	y = 0,0067x + 0,0038
UDP-GalNAc	UV	32,6	26,1	10,1	6,8	4,3	4,0	4,7	4,8	y = 0,0379x + 0,0776
UDP-GalNAc	MS	22,3	21,1	19,7	14,0	13,0	14,2	11,2	13,2	y = 0,1215x + 0,0644
UDP-Glc	LF	5,0	2,0	1,3	1,6	1,2	1,0	0,8	0,6	y = 0,0065x + 0,0143
UDP-Glc	MS	3,9	4,7	9,2	7,1	8,6	8,0	6,0	4,3	y = 0,0525x + 0,0540
UDP-GlcNAc	UV	3,0	1,2	0,6	1,0	1,0	0,8	0,9	0,4	y = 0,0056x + 0,0261
UDP-GlcNAc	MS	3,9	4,0	8,9	6,7	6,4	7,6	7,0	7,0	y = 0,0702x + 0,0044
UMP	MS	4,5	4,1	9,1	8,9	10,2	7,6	6,8	7,5	y = 0,0728x + 0,0111
UMP+UDP-G	UV	4,0	1,9	0,8	1,0	1,1	0,8	1,0	0,7	y = 0,0073x + 0,0156
UTP	UV	1,5	1,4	0,6	0,8	1,0	0,8	1,0	0,8	y = 0,0090x

Die angegebene relative Standardabweichung entspricht dem Median der Werte der verschiedenen Messsequenzen für jede Standardverdünnung. Die relative Standardabweichung ist aus Gründen der Anschaulichkeit gegeben. Die letzte Spalte zeigt die Funktion zur Approximation der Standardabweichung. Diese Funktion wurde durch lineare Regression nach dem minimalen-fehlerquadrate Verfahren ermittelt.

Tabelle A 10: Zusammenfassung der Anpassung (Summe der Fehlerquadrate) für die Ergebnisse der Optimierung gemäß dem fraktionellen faktoriellen Versuchsplan für die Methoden „MeOH/Kochen“ (A) und „MeOH/$CHCl_3$“ (B).

(A) MeOH/Kochen

Zielgröße	**Nukleotidgehalt**		***Energy Charge***		**F16bP-Gehalt**		**Absorp. 280 nm**	
R^2	**0,991**		**0,992**		**0,986**		**0,999**	
ANOVA / p-Wert	**0,0555**		**0,0539**		**0,0904**		**0,0086**	
Term	***Schätz-wert***	***p-Wert***	***Schätz-wert***	***p-Wert***	***Schätz-wert***	***p-Wert***	***Schätz-wert***	***p-Wert***
Schnittpunkt	1,000	<,0001	1,000	<,0001	1,000	0,0023	1,000	<,0001
Waschen [ja]	0,031	0,0327	0,014	0,1269	0,186	0,0613	-0,167	0,0020
Kochen [ja]	-0,017	0,1009	0,047	0,0127	0,448	0,0114	-0,034	0,0449
Ultras. Behandlung [ja]	0,020	0,0785	-0,007	0,3199	0,043	0,4696	0,015	0,1738
Puffer [H_2O]	0,009	0,2627	-0,015	0,1127	-0,098	0,1806	0,103	0,0052
Temp. MeOH	-0,003	0,6285	0,009	0,2516	-0,039	0,5064	0,017	0,1500
Volumen MeOH	-0,060	0,0094	0,040	0,0177	0,093	0,1936	-0,198	0,0014
Waschen [ja]×Kochen [ja]	0,014	0,1347	-0,009	0,2399	-0,003	0,9560	-0,006	0,5084
Waschen [ja]×Ultras. Behandlung [ja]	-0,003	0,6494	-0,010	0,2054	0,041	0,4883	0,051	0,0205
Waschen [ja]×Puffer [H_2O]	-0,035	0,0272	-0,005	0,4823	-0,136	0,1059	-0,012	0,2428
Waschen [ja]×Temp. MeOH	0,001	0,9335	-0,044	0,0146	-0,166	0,0755	-0,005	0,5839
Waschen [ja]×Vol. MeOH	0,029	0,0386	-0,002	0,7451	0,103	0,1666	0,031	0,0530
Kochen [ja]×Ultras. Behandlung [ja]	0,003	0,6902	0,007	0,3076	0,020	0,7164	0,003	0,7328
Kochen [ja]×Puffer [H_2O]	0,011	0,1922	0,014	0,1151	0,043	0,4706	0,017	0,1471

(B) MeOH/$CHCl_3$

Zielgröße	**Nukleotidgehalt**		***Energy Charge***		**F16bP-Gehalt**		**Absorp. 280 nm**	
R^2	**0,980**		**0,995**		**0,996**		**1,000**	
Anova / p-Wert	**0,2608**		**0,1266**		**0,1138**		**0,0319**	
Term	***Schätz-wert***	***p-Wert***	***Schätz-wert***	***p-Wert***	***Schätz-wert***	***p-Wert***	***Schätz-wert***	***p-Wert***
Schnittpunkt	1,000	0,0103	1,000	0,0041	1,000	0,0163	1,000	0,0024
Vol. $CHCl_3$	0,028	0,3370	0,002	0,7894	0,052	0,2943	-0,047	0,0502
Verhältnis MeOH / Puffer	-0,060	0,1693	0,002	0,7970	0,044	0,3343	-0,141	0,0167
Ultras. Behandlung[ja]	-0,054	0,1873	-0,048	0,0863	-0,261	0,0623	-0,021	0,1133
Puffer[H_2O]	-0,021	0,4157	-0,066	0,0620	-0,291	0,0560	0,135	0,0174
Anzahl der Extraktionen [1x]	-0,072	0,1415	0,006	0,5020	-0,111	0,1442	-0,080	0,0295
Vol. $CHCl_3$× Verhältnis MeOH / Puffer	-0,014	0,5468	-0,049	0,0836	-0,085	0,1872	-0,001	0,8574

Tabelle A 11: Zusammenfassung der Anpassung (Summe der Fehlerquadrate) für die Ergebnisse der Optimierung gemäß dem *Central Composite* Versuchsplan für die Methoden MeOH/Kochen (A) und MeOH/$CHCl_3$ (B).

(A) MeOH/Kochen

Zielgröße	**Nukleotidgehalt** (transformiert)		***Energy Charge*** (transformiert)		**F16bP-Gehalt**		**Absorp. 280 nm**	
R^2	**0,750**		**0,686**		**0,339**		**0,789**	
Anova / p-Wert	**<,0001**		**<,0001**		**0,0845**		**<,0001**	
Term	***Schätz-wert***	***p-Wert***	***Schätz-wert***	***p-Wert***	***Schätz-wert***	***p-Wert***	***Schätz-wert***	***p-Wert***
Schnittpunkt	0,825	<,0001	1,798	<,0001	0,814	<,0001	0,734	<,0001
Vol. MeOH	-0,150	<,0001	0,061	0,1325	-0,041	0,0221	-0,124	<,0001
Tricine Conc.	-0,019	0,2363	0,038	0,2491	-0,026	0,0672	-0,045	0,0026
Kochen	-0,010	0,6988	0,276	<,0001	-0,021	0,3463	-0,054	0,0163
Vol. MeOH × Kochen	0,008	0,7067	-0,111	0,0169	0,003	0,8811	-0,006	0,7425
Vol. MeOH × Vol. MeOH	-0,057	0,0004	-0,096	0,0026	-0,016	0,2061	-0,017	0,1661
Kochen × Kochen	0,010	0,6394	-0,141	0,0027	0,019	0,2896	0,022	0,2248

(B) MeOH/$CHCl_3$

Zielgröße	**Nukleotidgehalt (transformiert)**		***Energy Charge***		**F16bP-Gehalt**		**Absorp. 280 nm**	
R^2	**0,936**		**0,982**		**0,829**		**0,970**	
Anova / p-Wert	**<,0001**		**<,0001**		**0,0047**		**<,0001**	
Term	***Schätz-wert***	***p-Wert***	***Schätz-wert***	***p-Wert***	***Schätz-wert***	***p-Wert***	***Schätz-wert***	***p-Wert***
Schnittpunkt	1,465	<,0001	0,951	<,0001	0,751	<,0001	0,810	<,0001
Vol. $CHCl_3$	-0,316	<,0001	0,051	<,0001	0,039	0,2614	-0,192	<,0001
Vol. MeOH	-0,258	<,0001	0,045	<,0001	0,171	0,0005	-0,115	<,0001
Tricine Conc.	-0,054	0,1878	-0,005	0,1496	0,010	0,7643	-0,059	0,0033
Vol. $CHCl_3$ × Vol. MeOH	-0,084	0,1258	-0,025	0,0003	-0,137	0,0110	-0,071	0,0051
Vol. $CHCl_3$ × Vol. $CHCl_3$	-0,123	0,0166	-0,012	0,0089	-0,012	0,7378	-0,074	0,0015
Vol. MeOH × Vol. MeOH	0,031	0,4767	-0,014	0,0038	-0,076	0,0650	-0,074	0,0015

Tabelle A 12: Schätzung der Standardabweichung der vollständigen Bestimmungsmethode für die einzelnen Analyten und die verschiedenen Detektoren basierend auf mehrfachbestimmten realen Proben

Analyt	Detektion	Anzahl Proben	Mittelwert der Messwerte					Relative Standardabweichung [%]					Funktion zur Schätzung der Standardabweichung
			Kl. 1	Kl. 2	Kl. 3	Kl. 4	Kl. 5	Kl. 6	Kl. 1	Kl. 2	Kl. 3	Kl. 4	Kl. 5	Kl. 6	
3PG	LF	394	0,174	0,380	0,563	0,700	0,912	1,539	11,2	6,9	5,9	5,6	5,9	5,5	y = 0,05x + 0,0074
3PG	MS	394	0,143	0,378	0,615	0,758	1,031	1,727	11,8	10,0	8,4	9,0	10,6	9,0	y = 0,0938x + 0,0013
ADP	UV	394	0,885	1,778	2,491	3,262	3,920	5,383	4,7	5,6	6,4	7,0	5,2	5,2	y = 0,0524x + 0,0139
AMP	UV	394	0,162	0,283	0,340	0,409	0,534	0,941	8,8	12,2	11,6	10,4	13,3	9,0	y = 0,0907x + 0,0076
AMP	MS	394	0,158	0,317	0,385	0,462	0,586	1,142	12,3	10,7	12,0	14,1	14,4	16,0	y = 0,1487x
ATP	UV	394	7.269	17.047	29.720	42.914	47.618	60.358	2,7	2,3	2,7	2,5	2,4	2,0	y = 0,0211x + 0,0841
CDP	UV	394	0,061	0,091	0,116	0,138	0,179	0,278	15,3	14,6	11,0	15,3	10,0	8,4	y = 0,0637x + 0,0072
CDP	MS	367	0,031	0,046	0,064	0,089	0,130	0,219	17,1	12,7	13,4	13,2	11,2	13,4	y = 0,1282x + 0,0002
cis-Aconitate	MS	393	0,006	0,016	0,031	0,048	0,063	0,129	20,9	10,6	11,5	12,9	12,3	15,4	y = 0,145x
Citrate	MS	394	0,983	2.604	4.434	6.417	7.839	13.456	18,7	9,7	9,7	8,5	8,8	10,0	y = 0,0902x + 0,0288
Citrate + CDP	LF	394	1,041	2,211	3.606	5.167	6.264	10.889	5,4	4,7	4,0	3,1	3,4	3,0	y = 0,0273x + 0,0366
CMP	UV	391	0,081	0,132	0,198	0,269	0,355	0,498	18,0	15,8	20,1	22,8	16,7	16,0	y = 0,158x + 0,0055
CTP	UV	394	0,920	1.839	2.287	2.709	3.310	4.588	4,1	2,5	2,4	3,2	3,4	3,6	y = 0,0329x
Fructose-1,6-dP	LF	338	0,046	0,766	2.392	3.672	5.538	10.786	37,5	10,0	4,6	5,2	5,2	6,1	y = 0,0583x
Fructose-1,6-dP	MS	351	0,202	0,716	2.311	4.011	6.378	11.695	123,6	9,0	8,2	10,0	8,2	9,9	y = 0,088x + 0,0605
Fructose-6-P	MS	354	0,027	0,065	0,087	0,109	0,147	0,273	60,0	10,7	9,6	10,8	13,2	10,3	y = 0,074x + 0,0064
Fumarate	UV	394	0,143	0,237	0,355	0,590	0,796	1,356	9,9	7,3	6,0	3,8	4,2	5,0	y = 0,0418x + 0,005
Fumarate	MS	391	0,140	0,234	0,353	0,636	0,847	1,587	11,3	8,8	8,7	9,4	11,4	11,7	y = 0,2162x + 0,1017
GDP	UV	394	0,150	0,280	0,425	0,600	0,758	1,081	6,7	5,1	6,7	7,7	4,0	6,1	y = 0,0559x + 0,0017
Glucose-6-P	LF	360	0,012	0,049	0,105	0,183	0,305	0,959	43,1	27,1	17,4	12,4	10,9	6,2	y = 0,052x + 0,0115
Glucose-6-P	MS	360	0,023	0,073	0,141	0,243	0,374	1,131	73,3	15,7	11,6	12,7	10,2	10,1	y = 0,0928x + 0,0072
GMP	UV	390	0,022	0,039	0,053	0,066	0,089	0,131	30,4	17,4	17,2	13,6	8,0	8,2	y = 0,0299x + 0,0062
GMP	MS	394	0,034	0,053	0,074	0,094	0,112	0,170	11,5	10,2	12,3	13,6	9,0	9,7	y = 0,0909x + 0,0015
GTP	UV	394	1.503	3.263	5.629	7.653	8.604	11.743	4,5	3,2	3,3	3,0	2,6	2,7	y = 0,0244x + 0,0325
Isocitrate	MS	393	0,009	0,044	0,103	0,164	0,213	0,375	46,5	15,3	19,2	12,2	12,1	18,6	y = 0,1714x
Ketoglutarate	MS	387	0,369	0,733	1.391	2.968	4.563	7.287	9,8	7,5	11,1	12,4	11,4	12,3	y = 0,1202x
Malate	MS	394	0,557	1.291	2.201	3.897	5.173	8.680	14,0	10,5	9,2	11,5	13,3	10,8	y = 0,1131x + 0,0047
Malate+CMP	LF	357	0,542	0.982	1.547	2.777	3.913	6.877	7,4	7,6	6,2	6,5	6,4	6,2	y = 0,0614x + 0,0086
PEP	MS	393	0,014	0,057	0,102	0,171	0,230	0,635	30,8	16,2	14,4	13,6	13,3	10,0	y = 0,0946x + 0,0052
PEP+*cis*-Aconitate	LF	393	0,095	0,158	0,232	0,285	0,357	0,688	14,8	12,6	9,7	8,7	9,2	7,1	y = 0,0573x + 0,0098
Pyruvate	MS	394	0,665	1.030	2.075	3.671	6.036	9.033	9,8	13,1	12,6	13,4	13,0	12,8	y = 0,1291x
Ribose-5-P	MS	379	0,013	0,045	0,087	0,133	0,212	0,486	80,8	36,0	19,8	17,1	15,0	13,9	y = 0,1189x + 0,0083
Succinate	MS	394	0,226	0,710	0,991	1,341	1,743	3,069	52,0	16,8	14,2	10,8	14,9	11,2	y = 0,0885x + 0,0679
UDP	UV	394	0,043	0,081	0,115	0,143	0,206	0,440	17,5	15,6	12,7	14,8	10,8	6,8	y = 0,0517x + 0,0092
UDP-GalNAc	UV	394	0,102	0,246	0,749	1,187	1,507	2,495	10,7	4,8	2,8	3,3	3,9	3,6	y = 0,0348x + 0,0024
UDP-GalNAc	MS	394	0,154	0,253	0,681	1,162	1,491	2,716	1,4	5,3	10,9	13,9	8,9	8,1	y = 0,0855x + 0,0087
UDP-Glc	LF	175	1,141	2,162	2.960	3.505	4,201	6,111	12,5	9,2	17,0	12,3	10,7	15,0	y = 0,1348x
UDP-Glc	MS	391	0,398	1.292	2,106	2,749	3,476	5,527	18,9	11,8	13,7	11,5	10,5	11,3	y = 0,1057x + 0,0302
UDP-GlcNAc	UV	394	0,195	0,548	1.762	2.688	3.306	5,784	9,8	4,0	4,1	4,7	3,4	3,1	y = 0,0294x + 0,0185
UDP-GlcNAc	MS	394	0,512	0,721	1.579	2.491	3.296	6.217	0,9	3,7	7,3	8,0	8,3	8,1	y = 0,0804x
UMP	MS	332	0,156	0,304	0,435	0,580	0,738	1,343	7,8	9,4	12,9	12,3	10,6	7,9	y = 0,0767x + 0,0133
UMP+UDP-G	UV	394	0,935	1,911	2.765	3.493	4,303	8,608	3,0	3,8	2,1	3,0	3,2	3,1	y = 0,0306x
UTP	UV	394	2.495	4.910	6.823	8.221	10.279	15.760	3,3	2,7	1,2	3,2	2,6	3,8	y = 0,0315x

Mehrere Wells einer Sechs-Well Platte wurden parallel extrahiert und gemessen. Die relative Standardabweichung ist aus Gründen der Anschaulichkeit gegeben. Die Anzahl der genutzten Proben liegt zwischen 175 (UDP-Glc, LF) und 394 (Großteil der Metaboliten). Diese Anzahl wurde nach Ordnung entsprechend des Messwertes in sechs gleich große Klassen (±1) aufgeteilt. Die gezeigte relative Standardabweichung entspricht dem Median der Werte der verschiedenen Klassen. Die letzte Spalte zeigt die Funktion zur Approximation der Standardabweichung. Diese Funktion wurde durch lineare Regression nach dem minimalen-fehlerquadrate Verfahren ermittelt.

Z_02_Auftauenzellen_250603_IB Erstellt von Ilona Behrendt 29.05.2010

Arbeitsanweisung Nr. Z / 02

Auftauen von MDCK-Zellen

1.0 Ziel

Schonendes Auftauen von in der Gasphase von flüssigem Stickstoff langzeit-gelagerten MDCK-Zellen.

2.0 Material

- Zellen in Kryoröhrchen im flüssigen Stickstoff
- Stickstoffaufbewahrungsbehälter
- Schutzkleidung: Thermohandschuhe und Schutzschild
- Wasserbad 37°C
- Kulturgefäß (T25, besser T75)
- Vollmedium (komplett gemischt mit FCS und Tryptosephosphatboullion oder Pepton) oder serumfreies Medium (Episerf, Optipro, Ex-Cell) (auf Raumtemperatur vorgewärmt)
- Werkbank gesäubert
- Pipettierhilfe, Pipetten (steril)
- Desinfektionslösung (Descosept AF / Cleanisept) in Sprühflasche
- Sterillium für Händedesinfektion

3.0 Methode

- Werkbank 15min vor Arbeitsbeginn einschalten, desinfizieren
- Pipetten, Pipettierhilfe und Medium desinfizieren und in die Sterilbank stellen
- Handschuhe anziehen und desinfizieren
- unter Sterilbank Medium in die Zellkulturflasche pipettieren oder gießen (20 ml in eine T25-Flasche, 50 ml in eine T75-Flasche)
- Zellen aus dem Stickstoffbehälter holen (mit Schutzkleidung!!!) und schnell auftauen

  Gefriermittel DMSO ist toxisch. Die Zellen müssen möglichst schnell aufgetaut werden und in das Medium zur Verdünnung überführt werden!! Kryoröhrchen nicht über-Kopf-schütteln – Kontaminationsgefahr!

- Kryoröhrchen sofort nach dem Schmelzen des letzten Eisklümpchen von außen desinfizieren und unter die Werkbank stellen
- den Inhalt mit einer geeigneten Pipette in die Kulturflasche überführen (die Kulturflasche sollte mind. 20 ml Medium enthalten, um das DMSO ausreichend zu verdünnen)
- bei Problemen während der Anzucht:
  1. nach dem Anheften der Zellen (ca. 4 – 12 h) einen Mediumwechsel durchführen, um das DMSO aus der Kultur zu entfernen (siehe Arbeitsanweisung Z/03) oder
  2. gerade aufgetaute Zellen in ein mit 40 ml Medium (37°C) gefülltes 50-ml-Falkongefäß überführen, in der Zentrifuge bei 500 x g Zellen 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugieren, Medium abpipettieren und Zellen in einem geeigneten Volumen (Bsp. 50 ml) Medium aufnehmen und in die Zellkulturflasche überführen (Bsp. T75)

Arbeitsanweisung Nr. Z/ 04

Datum: 14.04.2000 **Autor: Dr. Annett Kiesel** **geprueft:**
geaendert am: 09.07.2003 **Autor: Ilona Behrendt** **geprueft:**
geaendert am: 20.06.2006 **Autor: Susanne Koenig** **geprueft:**
geaendert am: 11.09.2006 **Autor: Nancy Schlawin** **gerpueft:**

Passagieren von MDCK-Zellen in serumhaltigem Medium

1.0 Ziel

Langzeitkultivierung und Vermehrung von Zellen, zur Beimpfung mit verschiedenen Virusarten und spaeteren Aufarbeitung.

2.0 Materialien

- Kultur mit konfluent gewachsenen Zellen (25-cm^2-, 75-cm^2-, 175-cm^2-Flasche oder 850-cm^2-Rollerflasche); MDCK-Zellen: 4- bis 6-Tage alte, konfluent gewachsene Kultur
- Trypsin/ EDTA-Loesung (0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA, 37°C), 1:10-Verduennung aus Stammloesung, siehe Arbeitsanweisung M/07
- Vollmedium (GlasgowMEM komplett gemischt mit 10% FCS und Tryptosephosphatboullion/Pepton), siehe Arbeitsanweisungen M/02 oder M/04
- PBS (Raumtemperatur) siehe Arbeitsanweisung M/01
- foetales Kaelberserum (FCS) (auf Raumtemperatur vorwaermen) Firma:Gibco/Best.Nr.:10270106

3.0 Methode

- Kulturflaschen aus dem Brutschrank nehmen und desinfizieren, unter die Werkbank stellen
- Kulturflaschen aufschrauben, Deckel mit Oeffnungen nach oben legen (Deckel nach hinten legen, so dass man nicht darueber fasst beim Arbeiten)
- altes Medium in eine sterile Abfallflasche abgiessen (nicht den Rand beruehren!)
- die Zellen mit PBS-Loesung 2x waschen (s. Volumentab., I), gebrauchtes PBS in die sterile Abfallflasche abgiessen (dazwischen die T-Flaschen immer zuschrauben und schwenken)
- Trypsin/ EDTA-Loesung zupipettieren, ein duenner Fluessigkeitsfilm genuegt (s. Volumentab., II), und die Zellen bei 37 °C für ca. 20 min inkubieren
- in der Zwischenzeit neue Kulturflasche mit entsprechender Menge Medium befuellen (s. Volumentab., IV)
- nach 10 min Trypsininkubation die Flasche zum erstenmal leicht schuetteln, dann Zellen weiterinkubieren (insgesamt ca. 20 bis 30 min.) bis sich die Zellen nach erneutem kraeftigen Schuetteln vom Boden abloesen (optische Kontrolle und/oder unterm Mikroskop angucken)
- zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion FCS (s. Volumentab., III) zu den abgeloesten Zellen geben
- durch mehrmaliges (ca. 2-3x) Aufziehen des Inhaltes der Flasche in eine Pipette erfolgt eine Zellvereinzelung
  (um Schaum zu vermeiden, Pipetteninhalt am Flaschenboden oder an der Innenseite der Flasche auslaufen lassen!)
- von dieser Zellsuspension entnimmt man 1/3tel bis 1/6tel (bei Inkubation in Flaschen mit gleichem Volumen) und pipettiert dieses jeweils in eine der vorbereiten Flaschen (Berechnung der Einsaatdichte siehe unter Punkt 5 oder 6).
- ***Beachte!*** Fuer Zellkultivierung Deckel mit Membran benutzen (CO_2-durchlaessig), bei Arbeiten mit Virus in den T-Flaschen, geschlossenen Deckel (ohne Membran) nehmen.
- Flaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubieren

4.0 Volumentabelle

Kulturgefaess	**PBS zum Waschen** (I)	**Trypsin/EDTA** (II)	**FCS** (III)	**Vollmedium** (IV)
25-cm^2-Flasche	5 – 10 mL	1 mL	1 mL	15 - 20 mL
75-cm^2-Flasche	10 – 15 mL	3 mL	3 mL	50 mL

175-cm^2-Flasche	15 – 20 mL	5 mL	5 mL	100 - 125 mL
850-cm^2-Rollerflasche	40 – 50 mL	10 mL	10 mL	250 mL

5.0 „Faustregeln“ für die Anzucht von MDCK-Zellen

- Ausgangskultur: 4- bis 6-Tage alte, konfluent gewachsene Kultur (zu alte Kulturen vermeiden)
- Weiterkultivierung der Zellen in einer Kulturflasche mit gleichem Volumen: 1/3tel bis 1/6tel der Zellen in die neue Flasche geben.
- Vermehrung der Zellen für den Fermenter: Ampulle – T75 – T175 – Rollerflasche: jeweils die gesamten Zellen in das naechstgroessere Kulturgefaess ueberfuehren (Ampulle mit 2 - 5x10^6 Zellen/mL,; wenn weniger Zellen oder alte Zellen: Zwischenstufe über T25)
- Zellen nicht untereinander austauschen (bei Kontaminationsgefahr nicht mehr genau nachvollziehbar, woher diese stammt)
- fuer eine Reaktorkultivierung Zellen aus einer Passagierung kleiner 20 verwenden
- stets eine T 75 Flasche parallel zur Fermentation als back-up laufen lassen

6.0 Einsaat

6.1 Ermittlung des Einsaatvolumens

- ermittelte Zellzahl der trypsinierten Flasche Z (z. B. 1,2 x 10^6 Zellen / mL)
- Tage, in denen die Zellen bis zur Konfluenz wachsen sollen T (z. B. 4 d)
- empirisch ermittelte Einsaatdichte E, bei der die Zellen nach T Tagen in dem verwendeten Kulturgefaess konfluent sind (z. B. 0,8 x 10^7 Zellen pro 175 cm^2 werden benoetigt, um in 4 Tagen eine konfluente Kultur in einer 175-cm^2-Flasche zu erhalten)

- Rechnung: E : Z = Volumen [mL]

  Bsp:
  (0,8 x 10^7 Zellen) : (1,2 x 10^6 Zellen/mL) = 6,7 mL

  In eine 175-cm^2-Flasche muessen 6,7 mL einer Zellsuspension, die 1,2 x 10^6 Zellen/mL enthaelt, pipettiert werden, um nach 4 Tagen eine konfluente Kultur zu erhalten.

6.2 Bestimmung der Einsaat

- Einsaat = Zellen pro cm^2
  = (Einsaatvolumen x Zellzahl) : Oberflaeche

  Bsp.:
  = (6, 7 mL x 1,2 x 10^6 Zellen/mL) : 175 cm^2 = 4,6 x 10^4 Zellen/cm^2

  6,7 mL der Zellsuspension (mit 1,2 x 10^6 Zellen/ml) ergeben in einer 175-cm^2-Flasche eine Einsaat von 4,6 x 10^4 Zellen/cm^2.

- Was ist ein guter Richtwert pro cm^2 ?
  z.B. : 3,3 x 10^4 cells/ cm2 fuer Bioreaktor (≈ 3,0 x 10^5 cells/ml)
  2,9 x 10^4 cells / cm^2 fuer Rollerflaschen in 4 Tagen oder
  1,5 x 10^4 cells / cm^2 fuer Rollerflaschen in 7 Tagen
  7,6 x 10^4 cells/ cm^2 fuer T 175 (1:6 gesplittet)
  4,3 x 10^4 cells/ cm^2 fuer T175 (5ml) in Rollerflasche (850 cm^2)

7.0 Lagerung

Zellen wachsen in:
T-Flaschen bei 37°C im CO_2-Brutschrank im N1.06
Rollerflaschen im 37°C Rollerflaschenschrank im N1.06 oder im 37°C Brutraum auf den Rollerflaschengestell
Spinner cei 37°C im Brutraum auf einen Ruehrer

Z_04_Passagieren_MDCK_200606_SK BPT MPI-Magdeburg

Die eingefrorenen Zellen werden im Fluessigstickstoffbehaelter im N1.12 gelagert.
Die Dokumentation erfolgt ueber Tabellen mit den jeweiligen Farbcode und Kennnummern
die in einem Ordner im Raum N 1.06 abgeheftet sind.

8.0 Arbeitsblaetter

M / 01
M / 02
M / 04
M / 07
Z / 07

Version 1.5
Erstellt am: 29.03.2006
Aktualisiert am 08.08.2008
Autor: J. Schulze-Horsel

Kurzanleitung Zellzählgerät ViCell XR

1. Im Vorfeld zu beachten

- Das Gerät darf nur nach Einweisung durch die dafür zuständige Person bzw. nach Absprache durch eine andere eingewiesene Person benutzt werden.
- Die zu messende Probe darf **auf keinen Fall Microcarrier** enthalten, da sonst das Gerät verstopft wird!
- Validierter Messbereich (für Zelltyp „MDCK 100“: $9.6*10^4$ bis $1,0*10^7$ Zellen/mL (Gesamtzellzahl)

2. Material

Originalprodukte von Beckman Coulter:

Nr. 383260	Single Pack	250 Messungen, Reagenzien plus Probengefäße (ca. 240 Euro)
Nr. 383194	Quad Pack	1000 Messungen (4x Single Pack = ca. 845 Euro)
Nr.		Probengefäße (ViCell Cups)

Die Probengefäße können gespült und mehrmals verwendet werden.
Die Komponenten des Reagenzienpacks sind entweder bereits vorhanden oder können selbst hergestellt werden:

- Trypanblaulösung: 0,4 % w/v Trypanblau und 0,15 mol/L Natriumchlorid in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser)
  mit Papierfilter vorfiltriert, anschliessend 0,45 µm filtriert
- Desinfektionsmittel: Isopropanol (2-Propanol), 90 %
- Reinigungsmittel: Beckman Coulter Clenz (Nr. 8448222, 5 Liter)
- Pufferlösung dH_20, z.B. MilliQ-Wasser

Das benötigte Reagenzienvolumen pro 250 Messungen ist:.

- Trypanblaulösung	ca. 110 mL
allen anderen Reagenzien	ca. 220 mL benötigt

Auffüllen der Reagenzien:

Wenn das aktuelle Reagenzienpack leer ist, im Menü „Instrument“, „Replace reagent pack“ auswählen und den schrittweisen Anweisungen folgen.
Anstelle eines neuen Reagenzienpacks werden die Flaschen des vorhandenen Packs mit dem entsprechend benötigten Volumen (110 bzw. 220 mL) aufgefüllt.
Die Abfallflasche wird in eine Schottflasche umgegossen, autoklaviert und anschliessend in den Trypanblau-Abfall entsorgt.

3. Einschalten und Ausschalten der Geräte

Einschalten:

- ViCell einschalten (Schalter auf der Rückseite)
- Computer einschalten
- Software „ViCELL XR 2.03“ starten

Ausschalten:

- Software schließen
- Rechner herunterfahren
- ViCell ausschalten

4. Zellzählung

Anforderungen an die Zellsupension:

- Probenvolumen: minimal 0,5 mL, maximal 1,5 mL im Probengefäß
- Konzentrationsbereich (Herstellerangaben): $1{,}0 * 10^4$ bis $1{,}0 * 10^7$ Zellen/mL
- Proben mit einer Konzentration > $1{,}0 * 10^7$ Zellen/mL müssen vorverdünnt werden
- Proben, die Carrier enthalten können, müssen filtriert werden (< 100 µm), z.B. mit:
  - Partec Celltrics 100 µm, Nr. 04-0042-2318)
  - Becton Dickinson Bioscience Discovery Labware, Cell strainer, 70 µm, Nr. 352235

Messung:

5.1. Probe in Original-Probengefäß pipettieren und in das Probenkarussell stellen

5.2. „Log in sample“auswählen, dann im Untermenü eingeben:
- Pobenposition im Karussell angeben
- falls nötig: Probenbezeichnung eingeben
- Zelltyp auswählen (Standard: MDCK 50)
- „Dilution factor“ überprüfen: für unverdünnte Proben: 1.0
- für sehr wichtige Proben: „Save images“ auswählen (Speicher: 1 MB/Bild)
- Speichern der Ergebnisse als eigene Excel-Datei oder als Zeile in „Multi-run file“: „bpt_datensammlung.xls“ als Standarddatei auswählen
- zum Messen: „OK“ oder nächste Probe eingeben („Next sample“)

5.3. Start der Messung: „Start queue“, Dauer einer Messung: 3 Minuten

5.4. Gerät reinigt sich selbständig, Probengefäß wird ausgeworfen

5.5. das Karussell wird nach weiteren Proben durchsucht, die dann mit fortlaufender Nummerierung gemessen werden (sofern nicht anders eingelogt)

5.6. Speicherort für gezählte Proben (in Excel-Dateien): lokal und im Netzwerk
c:\daten\ViCell\Excell\
h:\bio\daten\vicellxr\Excell\
Wenn auf der lokalen Festplatte (c:\) kein Speicherplatz mehr vorhanden ist, müssen die lokalen Dateien in den gleichen Ordner auf dem Laufwerk (h:\) kopiert werden. Nach der Sicherung können die lokalen Dateien gelöscht werden. Die Ordner dürfen nicht gelöscht oder umbenannt werden.
Bei Problemen mit dem Speichern auf Spiegellaufwerk Software neu starten.

6. Aufzeichnung von Bioprozessen

Um Zellzählungen verschiedener Proben einer Zeitreihe zusammen zu speichern und auszuwerten, ist es sinnvoll diese als „Bioprocess“ zu sammeln und in einer Datei abzulegen.

- „File“ => „New Bioprocess“
- Bezeichnung für den Prozess vergeben, z.B. Fermentation100
- Zelltyp auswählen
- Speicherdatei auswählen, Daten werden im Unterordner \data\ abgelegt
- in der linken Menüleiste wird ein Icon hinzugefügt (Symbol: Erlenmeyerkolben)
- Messen der Proben des Prozesses: Icon anwählen und Probe eingeben („Log in sample“)

7. Messen von infizierten Zellproben

Mit dem ViCell können auch Zellzählungen von infizierten Kulturen gemacht werden. Dabei sind folgende Besonderheiten zu beachten:

- Vor dem Messen: die Schale mit gebrauchten Probengefäßen (innen) sowie die Abfallflasche entleeren
- Probengefäße unter der Virusbank befüllen
- Nach dem Messen: Schale in den Probengefäß-Virusabfall entleeren und desinfizieren, Inhalt der Abfallflasche in flüssigen Virusabfall geben

8. Enfernung von Microcarriern aus der Flusskammer

Die Flusskammer hat eine Höhe von ca. 100 µm. Daher können sich Microcarrier, die sich in den Proben befinden, in der Kammer festsetzen. Das kann zu veränderten Messwerten führen.
Um Microcarrier aus der Kammer zu entfernen folgende Prozedur durchführen:

- Probengefäß mit 2,5 mL verdünnter Natriumhypochlorid-Lösung (10 %ig, Sigma) füllen und in die erste Position des Probentellers stellen (1:10 verdünnen: 0,250 mL Natriumhypochlorid-Lösung + 2,25 mL Wasser)
- Befehl „Decontaminate“ im Menü „Instrument“ ausführen, dabei Anweisungen befolgen
- Die Reinigung dauert ca. 13 Minuten.
- Anschliessend kontrollieren, ob die Flusskammer frei ist („Instrument“ -> „Live-Image“)
- Die Option „Live-Image“ wieder deaktivieren

01.07.2008 G_6_Arbeitsanweisung_DX320_090123_jr6

Arbeitsanweisung

BioLC Anlage DX-320

1. Ziel ... 2
2. Verantwortliche ... 2
3. Messprinzip ... 2
4. Materialien ... 2
   4.1. BioLC DX-320 ... 2
   4.2. Weitere Materialien ... 5
5. DX-320 Anlage einschalten ... 5
   5.1. Falls die Anlage lange Zeit außer Betrieb war: ... 5
   5.2. Starten die DX-320 Anlage nach Stromausfall: ... 7
6. DX-320 Anlage ausschalten ... 8
   6.1. 1. Anlage für 2 bis 5 Stunden ausschalten ... 8
   6.2. Anlage für lange Zeit ausschalten (mehr als 5 Stunden) ... 8
7. Tägliche Pflege der DX-320 Anlage ... 9
8. Typischer Routinebetrieb ... 9
   8.1. Eluent: ... 9
   8.2. Säulen: ... 10
   8.3. Gradient: ... 10
   8.4. Betrieb des MS-Detektors ... 11
   8.5. Erstellen einer Sequenz ... 12
   8.6. Messungen von Extraktionsproben ... 12
   8.7. Vorgehen nach der Messung ... 13
9. Troubleshooting ... 15
10. Files abspeichern und auf CD brennen ... 16
    10.1. Files als .cmb abspeichern (zum Verschicken zu „Dionex“) ... 16
    10.2. Files als .xls abspeichern ... 16
    10.3. Daten auf CD brennen ... 16

01.07.2008 G_6_Arbeitsanweisung_DX320_090123_jr6

1. Ziel

Chromatographischen Trennung von organischen Säuren und anionischer Salze in Mediumproben sowie Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen von organischen Säuren, Zuckerphosphaten und Nukleotiden in tierischen Zellen und Mikroorganismen.

2. Verantwortliche

Dr. Yvonne Genzel, Joachim Ritter, Susanne König

3. Messprinzip

Entsprechend ihrer Ladung werden Anionen unterschiedlich lange auf der Chromatographiesäule zurückgehalten. Die Elution erfolgt mit KOH bis max. 100 mM. Die Leitfähigkeitsdetektion ermöglicht die Detektion von Anionen aller Art, wohingegen bei UV-Detektion vor allem Nukleotide, aber auch einige organische Säuren gemessen werden können. Details zur Detektion werden weiter unten gegeben. Zusätzlich besteht die Möglichkeit mit Hilfe eines MS-Detektors molekülspezifische Ionen zu detektieren.

4. Materialien

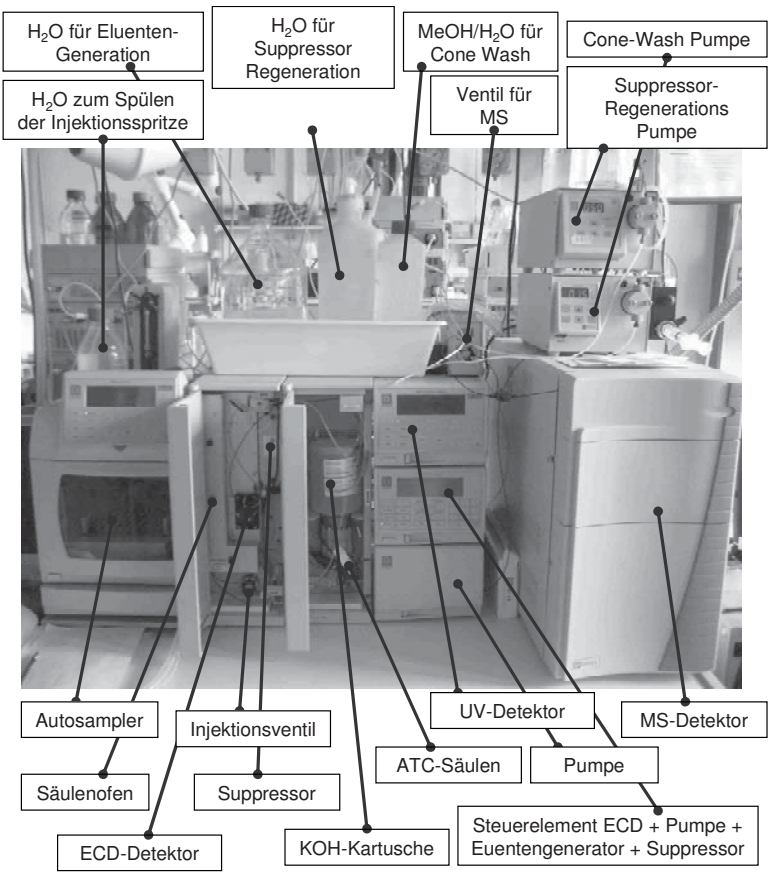
4.1. BioLC DX-320

Die DX-320 Anionenaustauschchromatograph besteht aus:

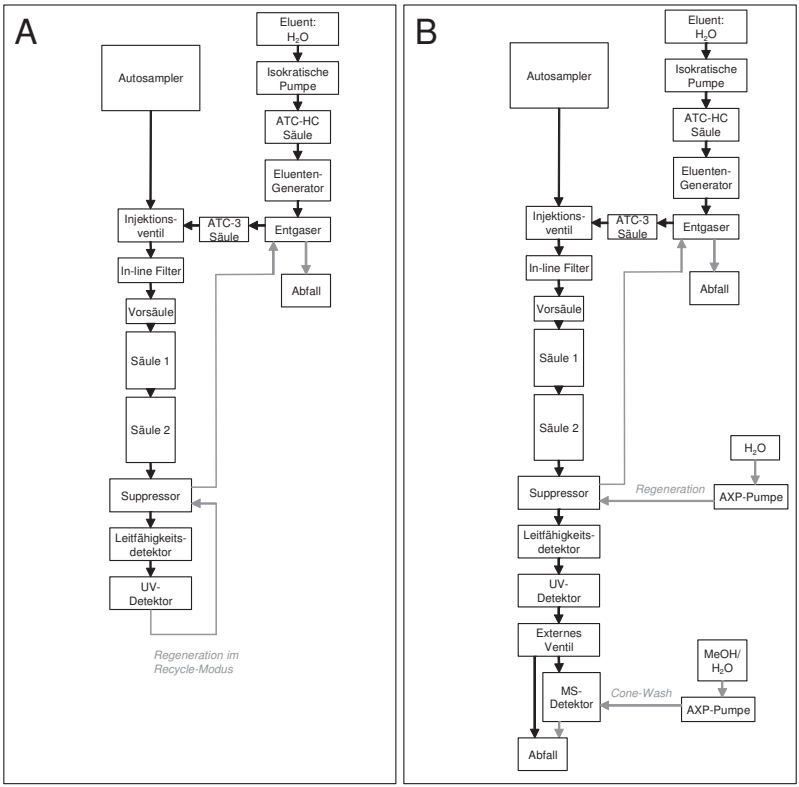
- → Autosampler (DX-AS50)
- → Thermoofen (DX-AS50)
- → UV Detektor (DX-AD25)
- → Konduktometrische Messzelle
- → Isokratische Pumpe (DX-IC25)
- → Suppressor (DX-ULTRA, 2 mm, P/N 53947)
- → Eluentenflasche (H_2O)
- → Flasche für Regenerationsstrom (H_2O, bei Betrieb des MS-Detektors)
- → Flasche für Cone-Wash (MeOH/ H_2O 50:50, bei Betrieb des MS-Detektors)
- → Abfallbehälter
- → PC mit Steuer- und Auswertesoftware
- → Vorsäule IonPac-AG11 (DX, 2x50mm, ProduktNr: 44079)
- → zwei analytische Säulen in Reihe: 2 x IonPac-AS11 (DX, 2x250 mm, ProduktNr: 44077)
- → EluGen EGC-KOH Kartusche (DX-EG40) ProduktNr: 053921
- → Entgaser
- → ATC-HC Säule (Trapsäule)
- → ATC-3 Säule (Trapsäule)

→ Inline-Filter
→ externes Ventil (I-Valve; für MS-Detektor)
→ externe AXP-Pumpe für Cone-Wash (für MS-Detektor)
→ externe AXP-Pumpe für Regenerationsstrom (bei Betrieb des MS-Detektors)
→ MSQ (MS-Detektor)

Aufbau der Chromatographieanlage (Juli 2008):



Eine schematische Darstellung ist in der folgenden Abbildung gezeigt:



In der Ionenchromatographie mit Leitfähigkeitsdetektion können die Elektrolyten im Eluenten die Detektion der interessierenden ionischen Analyten beeinträchtigen. Grundsätzlich würde mit steigender Konzentration des Eluenten die Basislinie ansteigen. Der Suppressor führt einen Austausch von K+-Ionen durch H+-Ionen, welche elektrolytisch hergestellt wurden, durch. Das so entstehende Wasser ist neutral und erzeugt kein Signal am Leitfähigkeitsdetektor.

Der Eluentgenerator dient zur Herstellung des KOH Eluents mittels deionisiertem Wasser zum Zeitpunkt des Gebrauchs. Die EluGen KOH Kartusche bestehet aus einer Kammer zur Erzeugung der KOH Konzentrationen und einem K+ Ionenreservoir. Zur Herstellung der KOH wird deionisiertes Wasser durch die Kammer gepumpt. Durch den angewandten Strom an der Kammer finden elektrolytischen Prozesse statt, die zur Erzeugung der Konzentrationen von KOH führen.

1.1. Weitere Materialien

→ Probenfläschchen (1,5ml Vials mit Drehverschluss und perforierten Septen)

→ 50 ml Plastikspritze

→ dest. Wasser (Milliporeanlage „Gradient“)

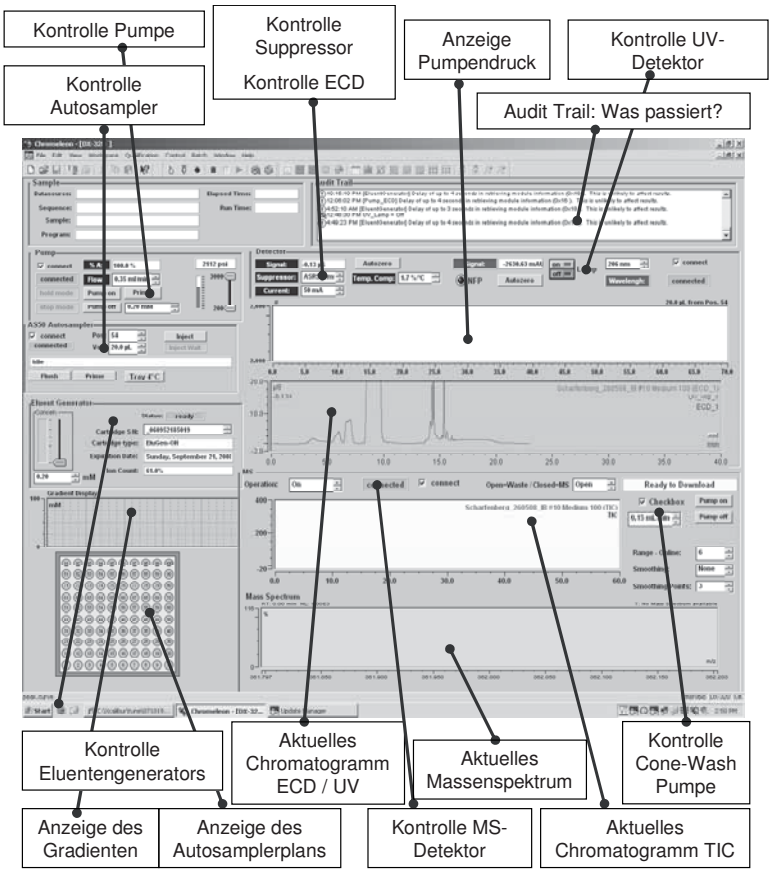
→ MeOH (für Cone-Wash bei MS-Betrieb)

2. DX-320 Anlage einschalten

2.1. Falls die Anlage lange Zeit außer Betrieb war:

- Computer hochfahren (Name: cmsrvbio Kennwort: chrom212)
- Abwarten bis das Netlog-script sich geöffnet hat → auf ok klicken
- Falls MS-Detektor benutzt wird, kann XCalibur gestartet werden (Doppelklick auf Symbol „Diagnose“ (erweitertes Menü; mit zusätzlichen Informationen → Empfehlung) auf der rechten Seite des Bildschirms). Es erscheint ein gelber Punkt im task-bar rechts unten, der bei Doppelklick XCalibur öffnen lässt.
- Auf dem Bildschirm Chromeleonserver (Symbol rechts unten in Taskleiste) durch Doppelklick starten.
- Dann kann Chromeleon (Symbol rechts) gestartet werden (für den Fall, dass Chromeleon vor XCalibur gestartet wird, wird automatisch das „Tune“ Menü für XCalibur gestartet, da der die Chromeleon Serverkonfiguration dies so festlegt).
- Anschließend kann das Chromeleon-Panel (DX320_ms.pan) unter in der Datenbank „PC478_local“ im Ordner „Panels_with_AXP-MS“ gestartet werden.
- Die Zwischenverbindungen ausbauen und die Säule und Vorsäulen einbauen (Flussrichtung beachten).
- Der Suppressor mit den entsprechenden Kapillaren verbinden (Flussrichtung und Anschlüsse beachten).
- Milli-Q Wasser in der Eluentenflasche ersetzten. Vorher die Flasche mindestens 6x spülen (Empfehlung, da auf diese Weise keine negativen Erfahrungen gemacht wurden).
- Milli-Q Wasser für Regeneration ersetzen, 6x die Flasche spülen
- MeOH/ H_2O ersetzen
- Autosampler, Pumpe und Detektoren, Vakuumvorpumpe für MS nacheinander einschalten

Aufbau des Panels (Juli 2008):



- im DX-320 Control Panel:
  - **Autosampler** connect, auf „Tray 4°C“ klicken, um auf die Temperatur von 4 °C zu kommen.
  - **Ofentemperatur** auf 25 °C einstellen (in DX-320 Control Panel → Command → Sampler → Column Temperature → auf 25°C→execute)
  - **Pumpe** connect, Eluent A auf 100% einstellen und mit der Spritze entgasen, Flussrate 0,35 ml/min.
  - Bevor die Pumpe eingeschaltet wird, müssen die Säulen auf 25°C hochheizen!

- ie Pumpe ca. 30 min laufen lassen.
- **Suppressor** auf 50 mA ansetzen und 15 min laufen lassen, bis die Basislinie sich stabilisiert.
- Die Reihefolge und die Wartezeiten sind unbedingt einzuhalten um die Lebensdauer des Suppressors zu erhöhen und die Sensivität der Messung zugewährleisten!
- **UV Lampe** anschalten. Es wird bei λ=220 nm oder 260 nm absorbiert.
- **MS-Detektor** connect; Pumpe (AXP für Cone-Wash) on; Fluss auf 0,15 ml/min
- **AXP Pumpe** für Regeneration starten (Fluss mindestens 0,3 ml/min)
- Eluentengenerator auf 100% stellen; manuelle Aufzeichnung starten. Nach ca. 5 min kommt ein großer Peak im Leitfähigkeitskanal (Verunreinigungen), anschließend pendelt sich das Signal auf einem konstanten Plateau ein. Je nach Leistungsfähigkeit des Suppressors ist dieses Signal höher oder niedriger. Nach ca. 10 min Eluentengenerator auf 0,2 mM stellen. Nach weiteren 5 min fällte das Signal wieder etwa auf den Startwert ab. Falls der Suppressor gut arbeitet, kann nun die Messung begonnen werden.

- Grundsätzlich empfiehlt es sich nach längeren Betriebsunterbrechungen der Anlage, eine Reihe von Standards nach dem einschalten zu messen. Somit kann überprüft werden, ob die Trennung der Substanzen wie auch die Sensitivität der Detektoren den Erwartungen entsprechen.
- Neue Sequenz starten: Im Browser Sequenzen anklicken, dann den entsprechenden Monat und neue Sequenz starten (s. Sequenzen herstellen und starten).

1.1. Starten die DX-320 Anlage nach Stromausfall:

- Computer hochfahren (Name: cmsrvbio Kennwort: chrom212)
- Abwarten bis das Netlog-script sich geöffnet hat → auf ok klicken
- Falls MS-Detektor benutzt wird, kann XCalibur gestartet werden (Doppelklick auf Symbol „Diagnose“ (erweitertes Menü; mit zusätzlichen Informationen → Empfehlung) auf der rechten Seite des Bildschirms). Es erscheint ein gelber Punkt im task-bar rechts unten, der bei Doppelklick XCalibur öffnen lässt.
- Auf dem Bildschirm Chromeleonserver (Symbol rechts unten in Taskleiste) durch Doppelklick starten.
- Dann kann Chromeleon (Symbol rechts) gestartet werden (für den Fall, dass Chromeleon vor XCalibur gestartet wird, wird automatisch das „Tune“ Menü für XCalibur gestartet, da der die Chromeleon Serverkonfiguration dies so festlegt).
- Anschließend kann das Chromeleon-Panel (DX320_ms.pan) unter in der Datenbank „PC478_local“ im Ordner „Panels_with_AXP-MS“ gestartet werden.
- Die Zwischenverbindungen ausbauen und die Säule und Vorsäulen einbauen (Flussrichtung beachten).
- Der Suppressor mit den entsprechenden Kapillaren verbinden (Flussrichtung und Anschlüsse beachten).

- Milli-Q Wasser in der Eluentenflasche ersetzten. Vorher die Flasche mindestens 6x spülen (Empfehlung, da auf diese Weise keine negativen Erfahrungen gemacht wurden).
- Milli-Q Wasser für Regeneration ersetzen, 6x die Flasche spülen
- MeOH/ H_2O ersetzen
- Autosampler, Pumpe und Detektoren, Vakuumvorpumpe für MS nacheinander einschalten

Eluentengenerator auf 100% stellen; manuelle Aufzeichnung starten. Nach ca. 5 min kommt ein großer Peak im Leitfähigkeitskanal (Verunreinigungen), anschließend pendelt sich das Signal auf einem konstanten Plateau ein. Je nach Leistungsfähigkeit des Suppressors ist dieses Signal höher oder niedriger. Nach ca. 10 min Eluentengenerator auf 0,2 mM stellen. Nach weiteren 5 min fällte das Signal wieder etwa auf den Startwert ab. Falls der Suppressor gut arbeitet, kann nun die Messung begonnen werden.

Im DX-320 Control Panel wird unter Batch→Edit angezeigt , was alles läuft, laufen soll oder gelaufen ist. Wenn eine Sequenz gelaufen ist, kann man unter Batch→Edit→entsprechende „Sequenz“ anklicken→Remove diese rausnehmen.

Im Browser→DX-320→ im entsprechenden Monat kann man feststellen, wo die Anlage nach dem Stromausfall stehen geblieben ist. Alle Proben, die mit „Finished“ bezeichnet sind, sind schon gelaufen. Die, die mit „Single“ bezeichnet sind, müssen noch laufen.

Die Anlage kann wieder gestartet werden (s. Sequenz starten).

1. DX-320 Anlage ausschalten

1.1. 1. Anlage für 2 bis 5 Stunden ausschalten

- Im DX-320 ControlPanel
  - Suppressor auf 0 mA einstellen
  - UV Lampe aus
  - Autosampler disconnect
  - Pumpe disconnect
- Pumpe aus
- Die Anlage komplett ausschalten

1.2. Anlage für lange Zeit ausschalten (mehr als 5 Stunden)

- Im DX-320 ControlPanel
  - Suppressor auf 0mA einstellen
  - UV Lampe ausschalten
  - Autosampler disconnect

- Pumpe disconnect

- Suppressor ausbauen („Eluent In“ und „Eluent Aus“, bzw, „Regen In“ und „Regen Aus“ mit Zwischenstück zusammenverbinden). Den Suppressor mit dest. Wasser spülen und mit Blindstopfen verschließen.
- Die Säule und Vorsäule ausbauen und im Kühlschrank lagern
- Die Kapillaren mit Zwischenstücken verbinden
- Das System ca. 2 Tage mit Wasser laufen lassen
- In den Eluentenflaschen ein bisschen NaAzide dazugeben
- Die Anlage komplett ausschalten

1. Tägliche Pflege der DX-320 Anlage

Handschuhe und Schutzbrille benutzen!

- Ausreichend Wasser in der Eluentenflasche vorhanden (Verbrauch 500 mL/ 24h, d.h. bei kompletter Füllung (6l) können ca. 10 Tage gemessen werden)?
- Ausreichend Wasser in der Flasche zur Regeneration des Suppressors?
- Ausreichend MeOH/ H_2O für Cone-Wash vorhanden?
- Ausreichend Flüssigkeit in den Vials?
- Druck an der Pumpe überprüfen (ca. 1900 bis 2800 psi am Anfang einer Probemessung).
- Volumen der immer wieder verwendeten Standards und Wasser kontrollieren
- Täglich Autosampler Probenständer Kondenswasser entfernen
- Backup auf das Netz durchführen
- Entsorgen der Probenflaschen von der gemessenen Sequenz

2. Typischer Routinebetrieb

Handschuhe und Schutzbrille benutzen!

2.1. Eluent:

- Der Eluent wird automatisch durch den Eluentengenerator hergestellt. D.h. es muss ausschließlich H_2O nachgefüllt werden. Dazu gibt es eine 5-Liter-Flasche (Glas) die ein Volumen von ca. 6 l fasst. Wenn die Flasche voll ist, sind bei einem Volmenstrom von 0,35 ml/min bis zu einem Restvolumen von ca. 1 l ca. 10 Messtage möglich.
- Die Flasche wird filtriertem H_2O (Milli-Q, 0,2 µm) befüllt. Dies kann während laufender Messungen erfolgen, allerdings nur, wenn das Restvolumen > 1 l ist, da sonst die Gefahr besteht, dass die Pumpe Luftblasen zieht. Bei einem Restvolumen von < 1 l in der Flasche sollte die Pumpe gestoppt werden (also nicht während einer Messung).

- Etwa einmal im Monat sollte das Wasser in der Flasche komplett gewechselt werden. Dabei wird der Suppressor auf 0 mA gestellt, die Pumpe gestoppt, die UV-Lampe ausgeschalten und das Restvolumen in der Flasche verworfen. Anschließend die Flasche 6x mit ca. 200 ml H_2O gespült (200 ml rein, Flasche horizontal halten, stark schwenken, ausgießen). Dies soll mögliche mikrobielle Verunreinigungen vermeiden bzw. auswaschen. Anschließend wird die weiße Fritte am Schlauchende durch eine neue ersetzt und die Flasche mit filtriertem H_2O wieder befüllt. Anschließend wird bei laufender Pumpe mit der 50-ml-Spritze zweimal ein Volumen von ca. 50 ml aus dem Pumpenkopf gezogen (Priming).
- Für den Fall, dass der MS-Detektor nicht in Betrieb ist, wird die Anlage im Rezirkulationsmodus betrieben. D.h. der Eluent fließt, nachdem er den Leitfähigkeitsdetektor und den UV-Detektor passiert hat durch die Regenerationskammer des Suppressors.

1.1. Säulen:

- Im Routinebetrieb wurden die Chromatographiesäulen (Vorsäule, Trennsäule 1, Trennsäule 2) nach etwa sechs Monaten ausgetauscht. Typischerweise war nach dieser Zeit das Trennverhalten der Säule verschlechtert, was sich insbesondere bei den Peakpaaren Succinat/Malat und Citrat/UDP-GlcNAc niedergeschlagen hat. Diese Substanzen waren somit schlechter zu trennen. Für den Fall der Nutzung der Anlage zur Messung von Pyruvat spielt diese verschlechterte Trennung keine Rolle. Da Pyruvat nie im Routinebetrieb gemessen wurde, kann bezüglich der Nutzungsdauer keine Empfehlung gegeben werden. Beim Einbau der Säulen ist auf die vorgegebenen Flussrichtung zu achten.
- Für den Fall eines unkontrollierten Druckanstieges kann es hilfreich sein nach gewisser Zeit die Fritten vor den Säulen zu wechseln. Falls ein Wechsel der Fritte vor der Vorsäule keine Verbesserung bringt, empfiehlt es sich, weitere Fritten der Logik entsprechend zu tauschen. Zu beachten ist, dass die Säulen vor dem Ausbau der Fritten gekühlt werden um ein Herausquellen des Säulenmaterials zu vermeiden.
- ATC-Säulen:Die ATC-3 Säule wurde im Verlauf der letzten 4 Jahre nie gewechselt oder gereinigt.Die ATC-HC Säule wurde mit NaOH (2M) gegen die Laufrichtung gespült. Dies kann durchgeführt werden, wenn die Basislinie nicht mehr stabil bleibt, sondern zum Ende des Chromatogramms (mit der KOH-Konzentration im Eluenten) ansteigt.

1.2. Gradient:

- Die Entwicklung des Gradienten zur Messung von Proben für die intrazellulären Metabolite war ein iterativer Prozess aus der Identifizierung von Metabolitpeaks und der Veränderung des Gradienten zur Verbesserung der Trennung. Prinzipiell ist der Gradient steil in Bereichen des Chromatogramms, in dem wenige, keine oder uninteressante Substanzen eluieren und flach in Bereichen, wo Substanzen sehr eng beieinander eluieren. Zu berücksichtigen ist hier allerdings, dass die Totzeit bei der beschriebenen Anordnung ca. 5 min beträgt, d.h. dass nach ca. 5 min die ersten Substanzen von der Säule eluieren (im Ausschlussvolumen). Somit geht der Gradient dem Chromatogramm ca. 5 min voraus. Da durch einen sehr flachen Gradienten die Elutionszeit stark verlängert wird, wurden vor den Bereichen mit einem sehr flachen Gradienten ein KOH-Peak gegeben. Dadurch konnte die Retentionszeit verkürzt werden, aber die Qualität der Trennung aufrecht gehalten werden.

- Da sich allerdings die Qualität der Säulen von Batch zu Batch unterscheiden und auch über den Nutzungszeitraum einer Säule qualitative Veränderungen der Säule auftreten, muss der Gradient durchaus gelegentlich verändert werden um eine optimale Trennung zu gewährleisten. Anhand der hier gegebenen Empfehlungen lässt sich dies aber problemlos durchführen. Weiterhin ist bei der Elution der Substanzen zu bemerken, dass die Metabolite bei stark abweichenden Retentionszeiten nicht mehr in den entsprechenden Fenstern zur Detektion für vor allem mittels MS aber auch UV (für CMP, Fumarat, AMP; wegen des Wechsels zw. 260 und 220 nm) eluieren.

1.1. Betrieb des MS-Detektors

- Bei Betrieb des MS-Detektors endet der Eluentenfluss im MS-Detektor, so dass ein getrennter Regenerationsfluss für den Suppressor betrieben werden muss. Dazu steht auf der Anlage eine 4 l Kunststoffflasche die mit H_2O befüllt werden muss. Auch diese Flasche kann während des Betriebs befüllt werden, aber es ist ebenfalls darauf zu achten, dass ein Restvolumen von ca. 1 l nicht unterschritten wird. Zur Befüllung kann direkt das Wasser der Milli-Q Anlage genutzt werden (keine Filtration nötig). Im gleichen Rhythmus wie die Eluentenflasche sollte auch bei dieser Flasche das Wasser ca. monatlich getauscht werden und dabei die Flasche 6x gespült werden. Die externe AXP-Pumpe wird bei einem Fluss von 0,2 ml/min betrieben, was eine Messdauer von über 10 Tagen gewährleistet.

- Des weiteren ist bei Betrieb des MS-Detektors die 2-Liter-Flasche mit MeOH/ H_2O regelmäßig zu befüllen. Dies dient dem Betrieb der „Cone-Wash“ Option beim MS-Detektor. Diese Pumpe läuft mit einem Fluss von 0,15 l/min. Die Flasche kann auch während des Betriebs befüllt werden, jedoch ist wiederum darauf zu achten, dass die Pumpe keine Luft zieht. Idealerweise sollte das Restvolumen nicht 0,5 l unterschreiten. Zum Befüllen der Flasche sollte ein 0,2-µm-filtriertes Gemisch (1:1) MeOH/H_2O verwendet werden, welches im Anschluss an die Filtration (Vakuumfiltration) noch weitere 5 min entgast werden sollte.

- Beim Betrieb des „Cone-Wash“ ist es wichtig, dass die Nadel sich möglichst nahe am Konus befindet um einer Tropfenbildung vorzubeugen (dies würde eine diskontinuierliche Spülung zur Folge haben).

- **Autotune**: Ein Autotune am MS-Detektor sollte durchgeführt werden für den Fall, dass die Sensitivität des Detektors nicht mehr zufrieden stellend ist. Zum Autotune müssen die Kapillaren anders verbunden sein, als im normalen Messbetrieb. Die Behälter mit dem entsprechenden Kalibranten sind im Routinebetrieb nicht angeschlossen und somit kann der Kalibrant nicht am Detektor ankommen. Zusätzlich ist für das Autotune ein Fluss (MeOH/ H_2O 50:50) nötig, der den Kalibranten transportiert. Dies kann über die Cone-Wash Pumpe ermöglicht werden. Für das Autotune müssen folgende Schritte durchgeführt werden:

    - MS Detektor Klappe öffnen
    - Schwarze Kapillare (vom externen Ventil kommend) an erster Stelle im MS-Detektor abschrauben und die nicht verbundene, rote Kapillare (vom internen Ventil) an dieser Stelle anschließen (so dass der Fluss vom internen Ventil zur ESI-Nadel gelangt)

- Kapillare vom Cone-Wash (rechts am MS-Detekor angeschlossen) abschrauben und auf der linken Seite des MS-Deketors (am eigentlichen Eingang des Flüssigkeitsstroms, vor dem internen Ventil) anschließen.
- Mittels Rechtsklick auf das MS-Symbol rechts unten in der Task-Leiste kann der Autotune gestartet werden

- Zusätzlich zum Autotune kann im MSQ-Fenster unter Detector Voltage die Spannung erhöht werden. Ein Arbeitsbereich von bis zu 3000 V ist vom Hersteller angegeben. Typischerweise sollten die Schritte der Erhöhung 50 V betragen. Normalerweise ist eine Erhöhung der Spannung nicht häufiger als alle 3-4 Monate nötig.

1.1. Erstellen einer Sequenz

- Das Erstellen einer Sequenz kann mit dem entsprechenden Wizard durchgeführt werden. Da aber typischerweise identische Einstellungen für verschiedene Sequenzen genutzt werden, empfiehlt es sich, eine neue Sequenz durch Kopieren einer alten Sequenz zu erstellen.
- **Vorbemerkung**: Die einzelnen Sequenzen sind nur in Chromeleon zu bearbeiten. Die Sequenzen kann man nicht mit dem Total Commander bzw. Windows Explorer kopieren, verschieben oder löschen.
- Erstellen einer Sequenz basierend auf einer alten Sequenz:
  - Im Browser die alte Sequenz markieren
  - Im Menü: *File* → *Save as* die Sequenz unter dem gewünschten Namen im Ordner des aktuellen Monats speichern (dabei werden die gemessenen Rohdaten nicht mitgespeichert).
  - Proben auf „single“ setzen
  - Messprogramm (.pgm) auswählen
  - Auswertungsprogramm (.qnt) auswählen
  - Injektionsvolumen überprüfen
  - Position der Proben überprüfen
- In der Vergangenheit wurden die Messungen der Sequenzen randomisiert, d.h. die Proben wurden in zufälliger Reihenfolge injiziert. Die Randomisierung wurde in einem Excel-Dokument (030904Random_ExtrM_N_2; auf dem Desktop) durchgeführt. Dies vereinfacht das Eintragen der Proben (Kopierfunktionen und „Ziehen von Zahlenreihen“ in Excel).
- wenn die oben genannten Schritte berücksichtigt sind, dann:
- im DX-320 Controll Panel → Batch → Start → Add → Chromeleon Local → DX320 → die entsprechende Sequenz auswählen → Open → Ready Check (wenn alles in Ordnung ist, kommt die Meldung „Ready Check OK“) → Start

1.2. Messungen von Extraktionsproben

Handschuhe benutzen!

- Die Messungen schließen sich üblicherweise an die Extraktion an, d.h. nach dem Lösen der Proben (in 600 µl H_2O), Zentrifugieren und Pipettieren von 120 µl in „kleine“ 150µl-Vials werden die Proben in den Autosampler gestellt.
- Vor dem Starten einer Messsequenz wurde im Panel die Konzentration des Eluenten für ca. 5 min auf 100 mM gesetzt, anschließend für weitere 5 min auf 0 mM um die Säule zu spülen.
- Zur rein optischen Überprüfung der Qualität der Messung (für sowohl Retentionszeiten als auch die Sensitivität des MS-Detektors) wurden im Jahr 2007 meist vor und nach einer Messsequenz mehrere 005 und 055-Standards (gelöst in H_2O) gemessen.
- Für die Quantifizierung von Proben wurde eine Standardverdünnung angefertigt. Dazu wurden 11,5 ml H_2O + 0,5 ml PBS + 0,5 ml Tricine (250 mM) gemischt. Davon 845 µl in jedes Vial (große Vials; 1500 µl) pipettiert. Anschließend folgende Mengen an Standard Stocklösung zugegeben:

0025 → 2,5 µl
005 → 5 µl
030 → 30 µl
055 → 55 µl
080 → 80 µl
105 → 105 µl
130 → 130 µl
155 → 155 µl

- Anschließend wurden alle Vials auf 1000 µl mit H_2O aufgefüllt (d.h. entsprechend der Differenz H_2O zugegeben → 152,5; 150; 125; ….)
- Proben im Programm eintragen

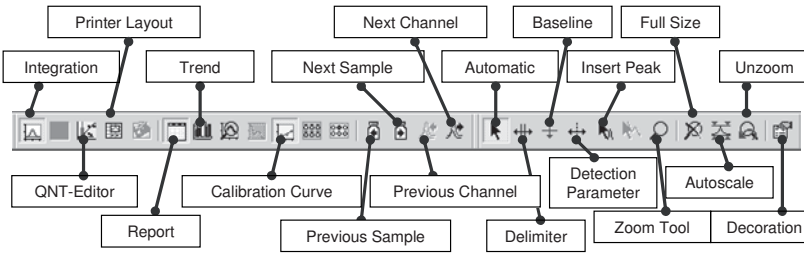
1.1. Vorgehen nach der Messung

Datamanagement:

Die Messungen werden lokal auf die Festplatte aufgezeichnet. D.h. im Falle einer physikalischen Zerstörung der Festplatte, wären die Daten verloren. Deshalb ist es wichtig, nach Beendigung einer Messsequenz die Daten auf das Gruppenlaufwerk zu kopieren. Die Rohdaten zu den Messungen ab September 2006 liegen in dem Ordner „bio/daten/chromel-dx320“, die entsprechende Datenbank heißt „dx320-net“. Zur Bearbeitung der Daten wurden auf einem lokalen Arbeitsplatzrechner einer weitere Datenbank erstellt. Somit wurden die Rohdaten dann vom Netz (Datenbank „dx320-net“) in die lokale Datenbank auf dem Rechner 532 kopiert (Datenbank „2007_05_dx320_local“) und dort bearbeitet. Um bearbeitete Sequenzen von Rohdaten zu unterscheiden wurden an bearbeitete Dateien das Kürzel „_bearb“ angehängt. Nach Abschluss der Bearbeitung wurden die bearbeiteten Dateien zusätzlich zu den Rohdaten in die Netzdatenbank („dx320-net“) gespeichert. Die lokale Auswertung wurde durchgeführt um die Arbeitsgänge zu beschleunigen und den Datenverkehr im Netz zu minimieren.

Auswertung der gemessenen Proben

- Für die Auswertung sind die meisten der Funktionen in der Werkzeugleiste nötig. Folgende Abbildung gibt einen Überblick.



- Beim Doppelklick auf eine gemessenen Probe wird diese normalerweise im Integrationsmodus (s. Abbildung) geöffnet. Definiert ist dies allerdings im rdf-File. Falls eine Sequenz nicht geöffnet wird, kann dies daran liegen, dass das „preferred rdf-file“ (Rechtsklick auf Sequenz → Optionen → General) nicht geladen werden kann (weil nicht vorhanden oder lokal auf einem anderen Computer o. ä.).

- Zur Veränderung der Detektionsparameter muss auf den QNT-Editor (s. Abbildung) geklickt werden. In den verschiedenen Registrierkarten können diverse Parameter eingestellt werden.

- Die chromatographischen Messungen werden unabhängig vom qnt-File gemacht. Ausschließlich das pgm-File ist dafür nötig. Chromeleon benötigt aber schon zum Start der Messungen ein eingetragenes qnt-File. Da Messung und Auswertung an unterschiedlichen Computern durchgeführt wurden und von den Sequenzen verschiedene Kopien vorlagen, war das qnt-File am Mess-Computer nie aktuell. Nach dem Kopieren der Sequenz wurde die aktuellste Version des qnt-Files in die Sequenz kopiert und danach für die Proben eingetragen.

- Anschließend wurde eine Probe geöffnet und das qnt-File neu gespeichert (auf *QNT-Editor* klicken, dann *File* → *Save as*) unter einem neuen Namen (z. B. Datum geändert). Dieses qnt-File wurde dann bei allen Proben eingetragen.

- Durch Überlagern der einzelnen Chromatogramme wurden die Retentionszeiten überprüft Hierzu die Proben im „Browser“ markieren und mit der rechten Maustaste „compare ECD“ aussuchen. Typischerweise wurden hierfür Standards vom Anfang und vom Ende der Messsequenz ausgewählt und übereinander gelegt. Auf *Decoration* klicken → *Peak Calipers* zeigt die Zeitfenster der entsprechenden Substanzen an. Für jeden Kanal können diese Fenster festgelegt werden. Diese Fenster können auch direkt verschoben werden, um bei verändertem Retentionsverhalten die Auswertung anzupassen. Die Fenster wurden so gewählt, dass sie einerseits möglichst klein sind, aber andererseits möglichst alle Retentionszeiten der entsprechenden Substanz umfassen. Alle auszuwertenden Peaks sollten so behandelt werden.

Nach dem Anpassen der Retentionszeiten wurden typischerweise sämtliche Substanzen in allen Proben und Standards in allen Kanälen überprüft und u. U. die Detektionsparameter angepasst, so dass möglichst alle Peaks richtig integriert

- wurden. Die Detektionsparameter können für jeden Kanal unabhängig definiert werden.
- Da sich bei längeren Messsequenzen selten gewährleisten lässt, dass alle Peaks gänzlich richtig integriert werden, wurden in einem erneuten Zyklus der Begutachtung der Peaks manuelle Modifikationen eingeführt. Dadurch wurden die Peaks, die nicht automatisch korrekt integriert wurden, richtig ausgewertet werden konnten.
- Im qnt-File wird die Art der Integration (Höhe oder Fläche) festgelegt. Dies kann für jeden Kanal unabhängig festgelegt werden.
- Im qnt-File wird die Kalibration definiert. Dies kann für jeden Kanal unabhängig festgelegt werden.
- Wenn alle Peaks richtig ausgewertet waren, wurde ein rdf-File geladen, welches der gewünschten Darstellung der Messwerte entsprach. Dazu: Im Menü *Workspace* → *Load Report Definition* klicken und das gewünschte rdf-File (z. B. 071204_Kult_n6) laden. Nicht in allen Proben sind sämtliche Metabolite nachzuweisen. Trotzdem kann als weitere Kontrolle, ob eine vollständige Integration aller Metabolitpeaks durchgeführt wurde, die Anzahl der „n.a.“-Felder entsprechend logischer Gesichtspunkte überprüft werden (z. B. ATP ist eigentlich in allen Proben vorhanden; d. h. wenn in der Spalte von ATP mehrere „n.a.“ auftreten, ist hier wahrscheinlich ein Fehler unterlaufen).

1. Troubleshooting

- Peakhöhe bzw. –fläche zu klein

  → Säule und Detektoren überprüfen

- Peakform stark unsymmetrisch

  → Säule überprüfen

- Peaks klein und Trennung nicht in zufriedenstellend

  → Suppressor mit 200 mN H2SO4 spülen. Hierzu: mit Plastikspritze ca. 3 ml 200mM H2SO4 in ELUENT OUT langsam und vorsichtig spritzen. 5 ml 200mM H2SO4 in REGEN IN spritzen. Den Suppressor 20 min stehen lassen. Den Suppressor mit dem chromatographischen System verbinden. Bei starken Verschmutzungen den Suppressor mit Isopropanol (verdünnt 1:10) spülen.

- Stark verschobene Retentionszeiten

  → Ist der Gradient der richtige?

  → Funktioniert der Eluentengenerator?

  → Ist der Druck konstant?

  → Falls dies Punkte ok sind, ist wahrscheinlich die Säule verändert. Somit muss wahrscheinlich der Gradient verändert werden um zu gewährleisten, dass insbesondere die entsprechenden Metabolite in den zugeordneten Fenstern für die MS-Detektion eluieren.

- Basislinie bei Leitfähigkeit steigt entsprechend des Gradienten an.

→ Ca. 2-3x H_2O oder Blank oder Std messen → Verändererung? Falls ja, weitere ca. 10 Proben messen, da Suppressor richtig eingefahren werden muss. Falls nein, AXP-Säulen mit 2 M NaOH oder KOH spülen (50 - 100 ml), evtl. aber auch Suppressor defekt

- Schwankungen in der Basislinie im UV

  → Evtl. defekte UV-Lampe → Diagnostic Test (am Detektorpanel) durchführen

- Pumpendruck zu hoch

  → Fritten vor Säulen wechseln (zuerst Vorsäule, usw.)

- Druck nicht konstant?

  → evtl. Luft injeziert; evtl. Injektionsvolumen nicht richtig ausgelitert; evtl. Probe verunreinigt (kontaminiert)

- Leck am Suppressor

  → Druck nach Säulen überprüfen (Suppressor ist auf der Niederdruckseite und max. 30 psi sollten anliegen), manchmal geht der Suppressor aber einfach kaputt

1. Files abspeichern und auf CD brennen

1.1. Files als .cmb abspeichern (zum Verschicken zu „Dionex“)

- Sequenz auswählen oder bestimmte Proben aus einer Sequenz
- File → Export/Back up → Back up → auf Browse anklicken → Ordner aussuchen, wo die Dateien gespeichert werden müssen → Dateiname geben → Speichern → Start → OK

1.2. Files als .xls abspeichern

- Bestimmte Probe aus einer Sequenz auswählen
- In „QNT“ Editor die Chromatogramme auswerten
- Auf „Printer Layout“ klicken → File → Save As → hier das File als Excel File speichern.

1.3. Daten auf CD brennen

- Im Browser mit der rechten Maustaste auf Backup anklicken → Dismount Datebase → OK
- CD einlegen → Daten CD erstellen → Daten CD projekt
- Quelledatenverzeichnis (H/daten/Chromeleon_Double) kopieren→ Datainame ändern
- CD aufzeichnen starten (Schreibgeschwindigkeit z.B. 32x)→Session abschließen → CD fertig stellen (File .mdb und .ini wichtig!)
- Aufzeichnung auf CD fertig → OK → mit der Maus auf „nein“ anklicken
- File → Mount Datasource → Browse → H/Daten/Chromeleon_Double → Back up Chromeleon_double → cm-local-mdb → öffnen → mit der Maus auf “nein” anklicken.. Back up ist wieder zu sehen.

Joachim Bernhard Ritter

Im Sandacker 1
D – 79576 Weil am Rhein

E-Mail: joachim.b.ritter@web.de
Tel.: +49 07621 5107240
Mobil: +49 172 8254088

geboren am 23.05.1977 in München
verheiratet, zwei Kinder

Berufspraxis

seit 05/09	NBx Bioprozessentwicklung, **Novartis Pharma AG**, Basel, Schweiz **Laborleiter**
12/03 – 04/09	Arbeitsgruppe **Bioprozesstechnik** (Prof. U. Reichl), **Max-Planck-Institut**, Magdeburg **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** (Doktorand) **Dissertationsthema**: „Charakterisierung tierischer Zellkulturen anhand einer Quantifizierung intrazellulärer Metaboliten aus dem Zentralstoffwechsel“
01/03 – 08/03	**University of British Columbia** (Prof. J. Piret), Vancouver, Kanada **Diplomarbeit**: “Characterization of Acoustic Cell Filter Performance for a CHO Cell Perfusion Culture using Experimental Design Methodology”
04/02 – 10/02	Firma **Alpha-Bioverfahrenstechnik**, Kleinmachnow **Studienarbeit**: “Optimierung eines Verfahrens zur Immobilisierung von tierischen Zellkulturen“
08/99 – 09/99	**Universitätsklinikum Charité**, Berlin **Praktikum**
03/98 – 04/98	**Brauerei Glossner**, Neumarkt i. d. Opf. **Praktikum**

Ausbildung

10/97 - 11/03	**Studium der Biotechnologie**, Technischen Universität Berlin Abschluss: Diplom-Ingenieur (Note: 1,5)
10/00 – 04/01	**Auslandssemester,** Dongseo-Universität, Pusan, Südkorea
07/96 – 05/97	Wehrdienst, Hauptgefreiter, Fernmeldeeinheit, Pöcking bei München
1983 - 1996	Grundschule und Gymnasium in Neumarkt i. d. Opf. Abschluss: Abitur (Note: 2,0)

Weitere Kenntnisse

EDV	MS Office (Excel, Word, PowerPoint), Origin, Chromeleon (Chromatographiesoftware), JMP (Statistiksoftware), AutoCAD
Sprachen	Englisch sehr gut in Wort und Schrift; Französisch Grundkenntnisse; Latinum

Privates

Ehrenamt	Vertreter der Doktoranden des Max-Planck-Institutes Magdeburg (2005-2007) im Doktorandennetzwerk der Max-Planck-Gesellschaft (u. a. Organisation von Softskill-Seminaren)
Freizeit	Basketball, Wandern, Malerei des Impressionismus

Publikationen

Ritter, J.B.; Wahl, S.A.; Freund, S.; Genzel Y.; Reichl U.; “Metabolic effects of influenza virus infection in cultured animal cells: Intra- and extracellular metabolite profiling”, submitted.

Ritter, J.B.; Genzel, Y.; Reichl, U.; "Metabolite Analysis in Mammalian Cells: How to generate reliable data sets?", Proceedings of the 20th ESACT meeting: Cells & Culture, Dresden, Germany. Ed.: T. Noll; Springer; in press.

Ritter, J.B.; Genzel Y.; Reichl U.; " Simultaneous extraction of several metabolites of energy metabolism and related substances in mammalian cells: Optimization using experimental design", Anal. Biochem., 2008, 373, 349–369.

Drouin H; Ritter, J.B.; Gorenflo V.M.; Bowen B.D.; Piret J.M.; "Cell Separator Operation within Temperature Ranges To Minimize Effects on Chinese Hamster Ovary Cell Perfusion Culture", Biotech. Progr., 2007, 23, 1473-1484.

Ritter, J.B.; Genzel Y.; Reichl U.; "Monitoring of Extracellular TCA Cycle Intermediates in Mammalian Cell Culture", Proceedings of the 19th ESACT Meeting: Cell Technology for Cell Products, 2007, Ed.: Rodney Smith; Springer; 603-605.

Ritter, J.B.; Genzel Y.; Reichl U.; "High-performance anion-exchange chromatography using on-line electrolytic eluent generation for the determination of more than 25 intermediates from energy metabolism of mammalian cells in culture", J. Chrom. B, 2006, 843 (2), 216-226.

Genzel Y.; Ritter, J.B.; König S.; Alt R.; Reichl U.; "Substitution of glutamine by pyruvate to reduce ammonia formation and growth inhibition of mammalian cells." , Biotech. Progr., 2005, 21 (1), 58-69.

Gorenflo V.M.; Ritter, J.B.; Aeschliman D.S.; Drouin H.; Bowen B.D.; Piret J.M.; "Characterization and Optimization of Acoustic Filter Performance by Experimental Design Methodology", Biotech. Bioeng., 2005, 90 (6), 746-753.

Poster und Vorträge

Ritter, J.B.; Genzel Y.; Reichl U.; "Metabolite Analysis in Mammalian Cells: How to generate reliable data sets?" (Vortrag), 20th ESACT meeting, June 17-20, 2007, Dresden/Germany

Ritter, J.B.; Genzel Y.; Reichl U.; "Die Herausforderung der Analyse von intrazellulären Metaboliten in Säugerzellen" (Poster), 24. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, September 26-29, 2006, Wiesbaden/Germany

Ritter, J.B.; Genzel Y.; Reichl U.; "Monitoring Energy Metabolism: The Challenge of Intracellular Metabolite Analysis of Mammalian Cells in Culture " (Poster), Cell Culture Engineering X, April 23-28, 2006, Whistler/Canada

Ritter, J.B.; Genzel Y.; Reichl U.; "Monitoring Energy Metabolism: The Challenge of Intracellular Metabolite Analysis of Mammalian Cells in Culture " (Vortrag), 1st Max Planck Workshop on "Metabolomics" April 4-5, 2006, Magdeburg/Germany

Ritter, J.B.; Genzel Y.; Reichl U.; "Monitoring of Extracellular TCA Cycle Intermediates in Mammalian Cell Culture" (Poster), 19th ESACT meeting , June 5-8, 2005, Harrogate/United Kingdom

Ritter, J.B.; Genzel Y.; Reichl U.; "Optimizing the Extraction of Key Molecules from Energy Metabolism in Mammalian Cell Culture" (Poster), Bioperspectives, May 10-12, 2005, Wiesbaden/Germany

Ritter, J.B.; Danova R.; Genzel Y.; Reichl U.; "High-Performance Anion-Exchange Chromatography for the Quantitative Analysis of Energy Metabolism in Mammalian Cells" (Poster), IICS, September 20-23, 2004, Trier/Germany

Ritter, J.B.; Danova R.; Genzel Y.; Reichl U.; "Identification of parameters relevant for the quantification of intracellular metabolites in mammalian cell culture" (Poster), ESBES 5, September 8-11, 2004, Stuttgart/Germany

Ritter, J.B.; Danova R.; Genzel Y.; Reichl U.; "Quantitative Analysis of Energy Metabolism in Mammalian Cells" (Poster), Bioperspectives, June 4-6, 2004, Wiesbaden/Germany